

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2019

Bc. Alena Ciburová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK ZÁZVORU

STUDY OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES OF GINGER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alena Ciburová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1228/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Alena Ciburová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Studium antimikrobiálních látek zázvoru

Zadání diplomové práce:

1. Prostudujte relevantní zdroje o bioaktivních látkách zázvoru a spektrofotometrické metody jejich stanovení.
2. Připravte sérii extraktů ze zázvoru. Stanovte obsah bioaktivních látek pomocí UV–VIS spektrometrie.
3. Ověřte antimikrobiální účinky získaných extraktů na vybrané druhy mikroorganismů.
4. Naměřená data vyhodnoťte.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Alena Ciburová
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Koreň zázvoru sa už tisícročia využíva vo východnej medicíne. Pre svoju výraznú špecifickú ostrú chuť je vyhľadávanou komoditou pri príprave jedál a nápojov na celom svete. V súčasnosti je popísané veľké množstvo jeho významných farmakologických pozitívnych účinkov na ľudský organizmus, ktoré sú spôsobené prítomnosťou veľkého množstva bioaktívnych látok.

Táto práca sa zaoberá štúdiom prítomných bioaktívnych látok – polyfenolov a flavonoidov, a vyhodnocovaním antioxidantných a antimikrobiálnych vlastností výluhov a macerátov vzoriek čerstvého a sušeného zázvoru.

Výsledky stanovenia naznačujú, že pre extrakciu bioaktívnych látok z rôznych druhov zázvorových vzoriek sú vhodné iné typy extrakčných činidiel. Najvyššiu antioxidantnú aktivitu vykazoval macerát čerstvého zázvoru v 96% etanole.

Antimikrobiálnu aktivitu vykazovala len vzorka 100% bio zázvorového čaju značky Sonnentor voči grampozitívnej baktérii *Micrococcus luteus*.

ABSTRACT

For thousands of years ginger rhizomes are used in traditional Chinese medicine. Because of his significant pungent flavour is commonly used in foods and beverages all over the world. Nowadays many of the beneficial pharmacological positive effects of ginger rhizomes are identified. Their occurrence is due to the high concentration of bioactive compounds.

This thesis is focused on analysing of occurrence of bioactive compounds such as polyphenols and flavonoids and their influence on antioxidation and antimicrobial properties of samples of fresh and dried ginger.

The results show that for extraction of bioactive compounds in different ginger samples is more suitable to use different types of extraction solvents. The highest antioxidation activity was measured for macerate of 100% bio ginger tea from Sonnentor company in 96% ethanol.

Antimicrobial properties were showed only for 100% bio ginger tea against gram-positive bacteria *Micrococcus luteus*.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Zázvor lekársky, bioaktívne látky, polyfenoly, flavonoidy, antioxidantná aktivita, antimikrobiálna aktivita

KEYWORDS

Zingiber officinale, bioactive compounds, polyphenols, flavonoids, antioxidation activity, antimicrobial activity

CIBUROVÁ, Alena. Studium antimikrobiálních látek zázvoru [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/108167>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Mária Veselá.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis studenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa veľmi rada poďakovala predovšetkým vedúcej mojej práce RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za jej odborné vedenie, cenné rady, ochotu a čas, ktorý mi venovala pri riešení mojej práce.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická časť	8
	2.1 Zázvor lekársky (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>).....	8
	2.1.1 Všeobecná charakteristika	8
	2.1.2 Morfológia	8
	2.1.3 Chemické zloženie.....	9
	2.1.4 Vlastnosti a využitie	12
	2.2 Biologicky aktívne látky	13
	2.2.1 Fenoly	13
	2.2.2 Flavonoidy	14
	2.2.3 Vitamíny	14
	2.3 Biologická aktivita	17
	2.3.1 Antioxidačná aktivita.....	17
	2.3.2 Antimikrobiálna aktivita.....	19
	2.4 Základné stanovenia biologickej aktivity	20
	2.4.1 Stanovenie antioxidačnej aktivity.....	20
	2.4.2 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity	22
3	Experimantálna časť	24
	3.1 Zoznam použitých prístrojov	24
	3.2 Zoznam použitých chemikálii	24
	3.3 Zoznam analyzovaných vzoriek.....	24
	3.4 Príprava vzoriek	25
	3.5 Príprava extraktov	25
	3.5.1 Príprava vodných a etanolových výluhov.....	25
	3.5.2 Príprava macerátov	25
	3.6 Zoznam použitých mikroorganizmov	25
	3.6.1 Charakteristika použitých mikroorganizmov	26
	3.7 Príprava kultivačného média.....	27
	3.8 Stanovenie celkových polyfenolov spektrofotometricky.....	27
	3.9 Stanovenie celkových flavonoidov spektrofotometricky.....	28
	3.10 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity pomocou ABTS· spektrofotometricky	29

3.11	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity	30
4	Výsledky a diskusia	31
4.1	Stanovenie celkových polyfenolov	31
4.2	Stanovenie celkových flavonoidov	37
4.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity	44
4.4	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity	48
5	Záver	53
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	54
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	64

1 Úvod

Už tisícročia ľudstvo využíva byliny a koreniny v každodennom živote. Vďaka svojim nutričným a liečivým účinkom sa čoraz viac uplatňujú v mnohých sférach. Môžeme ich nájsť ako súčasť potravín a nápojov, zložky liečiv, kozmetiky, či parfumov.

V súčasnosti vo veľkej miere narastá záujem o využívanie prírodných látok vo farmaceutickom priemysle. Veľké množstvo rastlín sa vyznačuje širokou škálou terapeutických účinkov. Tieto vlastnosti sú pripisované obsahu bioaktívnych zlúčenín. Tie nie len že chránia rastliny voči vírusom, baktériám či vláknitým hubám ale sa aj efektívne uplatňujú pri ochrane človeka pred ochoreniami. Zjednodušene môžeme definovať bioaktívne látky ako sekundárne metabolity rastlín, ktoré sú schopné vyvolávať farmakologický alebo toxikologický efekt na ľudský organizmus. Väčšina týchto bioaktívnych látok je v rastlinách zodpovedná za tvorbu sfarbenia, chuti a arómy.

Mnohé vedecké štúdie sa zaoberajú negatívnym vplyvom oxidačného stresu a voľných radikálov na množstvo fyziologických procesov v ľudskom tele. Prítomnosť nežiadúcich voľných radikálov môže vyvolať poškodenie DNA, či bunkových organel, mutácie a ich prítomnosť môže viesť až k začiatku karcinogénnych procesov. Látky schopné potlačiť oxidačný stres nazývame antioxidanty. Medzi najvýznamnejšie prírodné antioxidanty pochádzajúce z rastlinných materiálov radíme polyfenoly, flavonoidy, karotenoidy a vitamíny. Keďže sa vyskytujú ako súčasť komplexov signálnych a metabolických mechanizmov, ich prítomnosť je pre rastliny esenciálna.

Moderný životný štýl a zvyšujúci sa záujem o zdravie populácie vedie k zvyšovaniu dopytu po prírodných liečivách a potravinách, ktoré sú nie len schopné poskytovať zdravotné benefity, ale aj disponujú menším množstvom vedľajších účinkov. S tým rastie aj záujem o štúdium potencionálnych zdravotných benefitov sekundárnych metabolitov rastlín. S novými poznatkami o zastúpení bioaktívnych látok a ich účinkov môžeme získať širšie spektrum rastlín, ktoré môžeme využiť pri zdravotnej starostlivosti. Je však potrebné poznať aj vplyv spracovania, skladovania či iných manipulácií na ich prítomnosť a funkcionálnosť.

Zázvor lekársky je jednou z hlavných korenín využívaných nielen v ázijskej kuchyni, ale aj v tradičných ázijských medicínach. Známe sú jeho terapeutické účinky voči širokej škále ochorení ako gastrointestinálne ťažkosti, reuma, astma, alergia, diabetes, či dokonca rakovina. Tieto vlastnosti sú pripisované zastúpeniu veľkého množstva bioaktívnych látok a to hlavne polyfenolov – gingerolov a shogolov.

Vo svojej práci som sa práve preto venovala štúdiu a analýze bioaktívnych látok zázvoru a ich účinkom, ale aj vplyvu rôznych extrakčných činidiel a postupov. Porovnávané boli extrakty z čerstvého zázvoru a dvoch druhov sušeného zázvoru – koreninový mletý prípravok a bio zázvorový čaj. Stanovené boli koncentrácie polyfenolov a flavonoidov a následne bola meraná antioxidačná aktivita jednotlivých zázvorových vzoriek.

Vybrané extrakty boli následne testované pre svoju potencionálnu antimikrobiálnu aktivitu voči vybraným druhom baktérií.

2 Teoretická časť

2.1 Zázvor lekársky (*Zingiber officinale Roscoe*)

2.1.1 Všeobecná charakteristika

Zázvor patrí do čeľade d'umbierovité (lat. *Zingiberaceae*). Jeho latinský názov je *Zingiber officinale Roscoe*. Do čeľade d'umbierovité patrí takmer 150 druhov rastlín. Pravdepodobne pochádza z juhovýchodnej Ázie a v súčasnosti sa komerčne pestuje v Číne, Afrike, Japonsku, Indii a na Jamajke. Medzi popredných dodávateľov patrí Čína a India. Zázvor rastie v teplej vlhkej klíme subtropického až tropického pásma. Pre jeho rast sú najvhodnejšie dobre odvodnené piesčité, ílovité alebo červené pôdy [1,2,3].

Už od antických čias sa koreň zázvoru využíva vo východnej medicíne ako prírodné liečivo pri liečbe reumatizmu, nervových ochorení, astme, zápche, cukrovke či ochorenia d'asien a zubov. Okrem medicínskych účelov sa využíva ako korenina pri príprave potravín a nápojov. Jeho vysoká biologická aktivita je pripisovaná hlavne jeho aktívnym fytozlučeninám – flavanoidom, fenolickým látkam, 6-gingerolu, 6-shoagolu a zingerónu [4,5].

Známe sú dva základné druhy zázvoru – bledo žltý a červený. Žltý – *Zingiber officinale* var. *Officinale*, rastie vo všetkých regiónoch a je využívaný na komerčnú celosvetovú produkciu a využitie. Červený druh – *Zingiber officinale* var. *Rubrum*, rastie v oblastiach juhovýchodnej Ázie a Malajzie. Vyznačuje sa červeným sfarbením podzemku a bazálnej časti listnatých stoniek. Využíva sa v tradičnej medicíne a ako lokálna korenina. Červený zázvor obsahuje signifikantne väčšie množstvo flavonoidov [6].

V ostatných desaťročiach bolo v dôsledku rozvoja génového inžinierstva vyvinuté veľké množstvo nových typov s modifikovanými vlastnosťami. Jednotlivé typy sa od seba odlišujú vzhľadom, vôňou, chuťou či stupňom vláknitosti. Názvy komerčne využívaných typov sú zväčša odvodené od miesta, z kade pochádzajú [1,7,8].

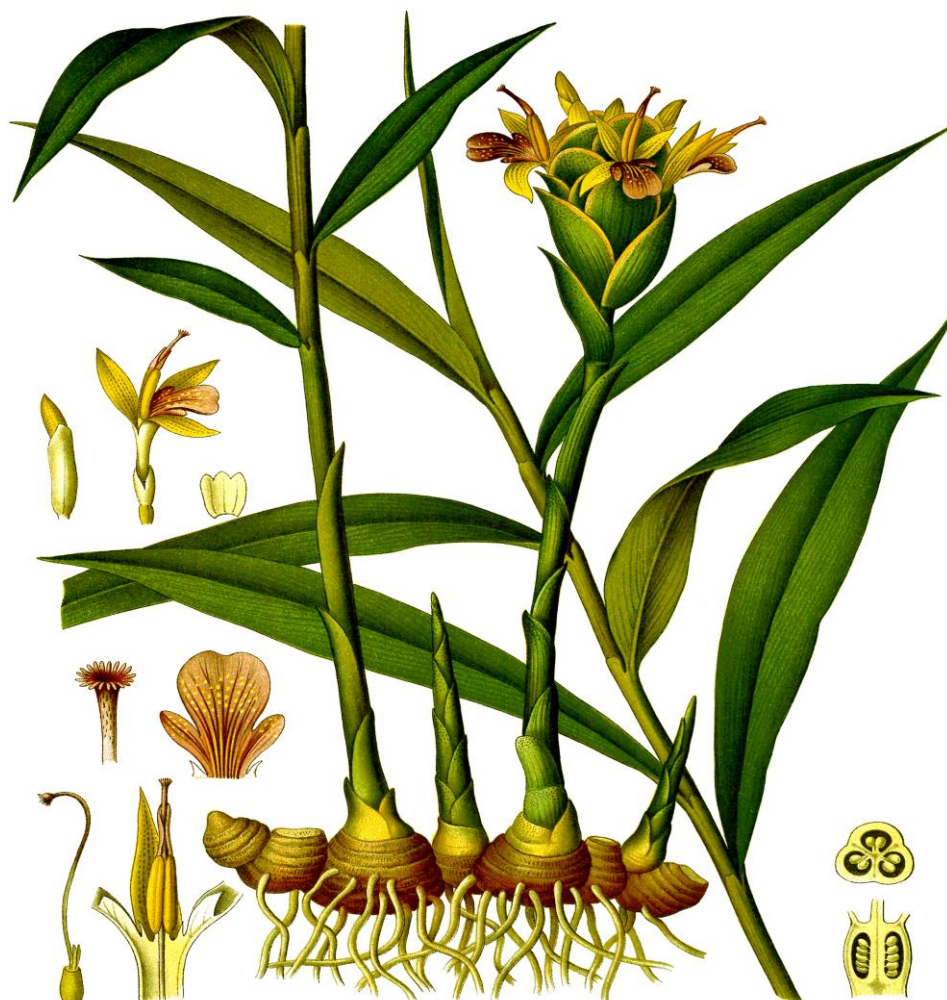
Vo všeobecnosti vôňa čerstvého podzemku zázvoru je citrusová, gáforovitá, kvetinová, ťažká, a zatuchnutá [9].

Podľa FDA (Food and Drug Administration) je zázvor považovaný za bezpečnú potravinu, teda nevykazuje žiadne známky toxicity pre ľudský organizmus [10].

Ekonomicky sú významné tri základné komodity koreňa zázvoru – čerstvý, sušený zázvor a konzervovaný zázvor [11].

2.1.2 Morfológia

Zázvor je trváca jednoročná rastlina dorastajúca do výšky 1,5 m. Z približne 3–16 cm dlhého a 3–4 cm širokého, dužinatého, článkovaného, nepravidelne vetveného podzemku vyrastá niekoľko štíhlych stoniek. Tie sú porastené dvomi radmi úzkych bledozelených, 5–30 cm dlhých a 8–20 mm širokých kopijovitých listov. Z podzemku vyrastajú taktiež kvetonosné šupinaté stonky, nesúce niekoľko žltých alebo bielych kvetov s pyskami vyrastajúcich z pazúch podporných tenkých listencov. Kvety sú usporiadané do súkvetí. Kvitnutie však nie je bežné a je ovplyvnené klimatickými podmienkami. Rozmnožuje sa výlučne podzemkami, na ktorých sa nachádzajú klíčky [2,7,12].



Obr. 1 Morfológia rastliny d'umbieru lekárskeho [14].

2.1.3 Chemické zloženie

2.1.3.1 Základná chemická charakteristika

Chemické látky a ich zastúpenie v podzemku zázvoru sa vo všeobecnosti líši od miesta jeho pôvodu, odrody, agroklimatických podmienok, či typu kultivácie a ich prítomnosť a pomer je rozdielny v čerstvom a sušenom zázvore. Chemické zloženie zázvoru pozostáva zo sacharidov, aminokyselín, enzýmov, lipidov, proteínov a vitamínov [13,15].

Najzastúpenejšou zložkou sú sacharidy, ktoré tvoria podstatnú zložku sušiny. Medzi najdôležitejšie sacharidické zložky patrí škrob (40–60 %), slizy a pentózany (7,6 %). V malom množstve je prítomná aj arabinóza, fruktóza, glukóza a sacharóza [13,15].

Z aminokyselín sú zastúpené: alanín, arginín, asparagín, kyselina asparágová, cysteín, kyselina glutámová, glycín, histidín, izoleucín, leucín, lyzín, fenylalanín, prolín, serín, treonín a valín. V podzemku zázvoru sa z lipidov nachádzajú voľné mastné kyseliny, lecitíny, kyselina fosfatidová a triacylglyceroly. Proteíny tvoria približne 9–12% sušiny – albumíny (35,6 %), glutenín (17,9 %), globulíny (16,9 %) a prolamín (11 %). Medzi vitamíny zastúpené v zázvore

patrí niacín, riboflavín, thiamín a vitamín C. Z minerálnych látok sa v podzemku zázvoru nachádzajú vápnik, železo, horčík, mangán, fosfor, draslík, sodík a zinok [3,15].

Charakteristická aróma zázvoru záleží hlavne na prítomnosti a zložení prchavého oleja, ktorý tvorí 1–3 %. Identifikovaných v ňom bolo viac ako 50 látok a to hlavne monoterpeidov (cineol, geraniol, kurkumen, atď.) a seskviterpenoidov (α -zingiberen (30–70 %), β -bisabolen, zingiberol, atď.). Pri sušení zázvoru dochádza ku vypareniu časti prchavého oleja, čo má za následok zoslabenie arómy [16].

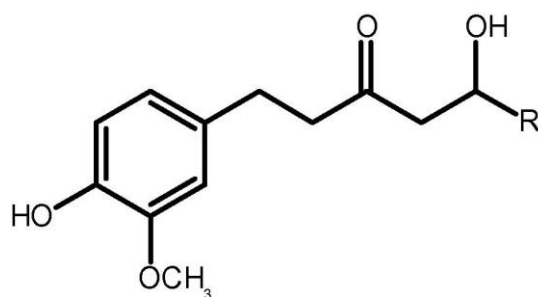
Prchavý olej však nenesie charakteristickú pálivú chuť zázvoru. Jej nositeľom je neprchavý oleoresin, nazývaný gingerin. Je to viskózna tmavohnedá látka pozostávajúca z gingerolov, shogaolov, paradol a zingeronu a iných nepálivých zložiek – tukov a voskov. Najpálivejšou zložkou je 6-gingerol, pričom jeho homológy 8-gingerol a 10-gingerol sú 4-15x menej pálivé. 6-shoagol je 2-60 krát menej pálivý [7,11,17,18,20].

Najvyužívanejšou metódou na výrobe sušeného zázvoru je prirodzené sušenie (shade drying) a sušenie horúcim vzduchom. Strata vlhkosti pri sušení prirodzene vedie k inhibícii mikrobiálneho rastu a prevencii niektorých biochemických zmien. Okrem toho spôsobuje stratu arómy, zmeny v nutričnom a chemickom zložení, fyzikálne zmeny a zmenu antioxidačnej aktivity. Dehydratácia zázvoru nevedie len k premene gingerolov na príslušné shoagoly, ale aj k vzniku nových chemických látok. Vo vzorkách sušeného zázvoru sa objavuje viac ako 30 látok, ktoré v čerstvom zázvore prítomné nie sú. Sú to napríklad 6-, 8-, 10- a 12-gingerdiony, či kurkumen. Zvyšovanie koncentrácie nových látok môže viesť k znižovaniu kvality zázvorového oleoresinu [16,19,21].

2.1.3.2 Fenolické látky

Gingeroly sú najviac zastúpené pálive zlúčeniny v podzemku čerstvého zázvoru. Najzastúpenejšími látkami v sušenom zázvore sú shogaoly. Obe patria medzi prchavé polyfenolové zlúčeniny – ketóny. Gingeroly a shogaoly obsahujú vanilylovú skupinu a dlhý alkylový reťazec. Celkový obsah gingerolov a shoagolov je v čerstvom podzemku 0,7–0,9 % a v sušenom 1,1–1,6 % [7,22].

Z gingerolov (Obr. 2) je najviac zastúpeným opticky aktívny žltkastý 6-gingerol. Tvorí približne 75% pálivých látok zázvoru. V menších koncentráciách sa vyskytujú aj gingeroly s odlišnou dĺžkou reťazca (4-, 5-, 8-, 10- a 12- gingeroly) [17].



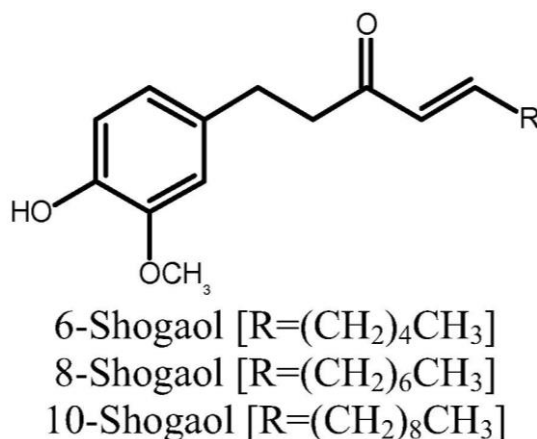
6-Gingerol [R=(CH₂)₄CH₃]

8-Gingerol [R=(CH₂)₆CH₃]

10-Gingerol [R=(CH₂)₈CH₃]

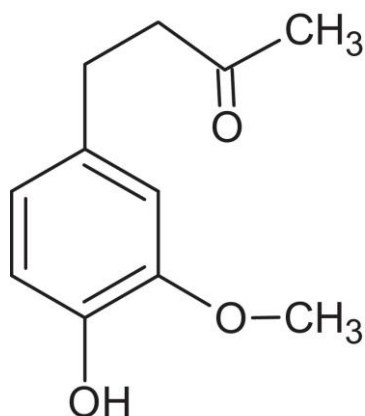
Obr. 2 Chemická štruktúra niektorých gingerolov [24].

Gingeroly sú termicky labilné zlúčeniny, ktoré ľahko podliehajú teplom katalyzovaným dehydratačným reakciám za vzniku príslušných shogaolov a zingerónov. K dehydratačným reakciám dochádza už pri teplote 60 °C. V dehydratovanom – sušenom zázvore sú najviac zastúpené vo forme 6-shogaolu. Okrem 6-shogaolu sa tu nachádzajú analógy gingerolov a to napríklad 6-, 8-, and 10-shogaol (Obr. 3). 6-shogaol sa takmer vôbec nevyskytuje v čerstvom zázvore. Rýchlosť a stupeň degradácie je ovplyvnená nie len spôsobom sušenia a charakterom vzorky, ale je aj závislá na pH. Najstabilnejšia je pri pH = 4 a teplote prostredia a pri teplote 100 °C a pH = 1 [16,22,25].



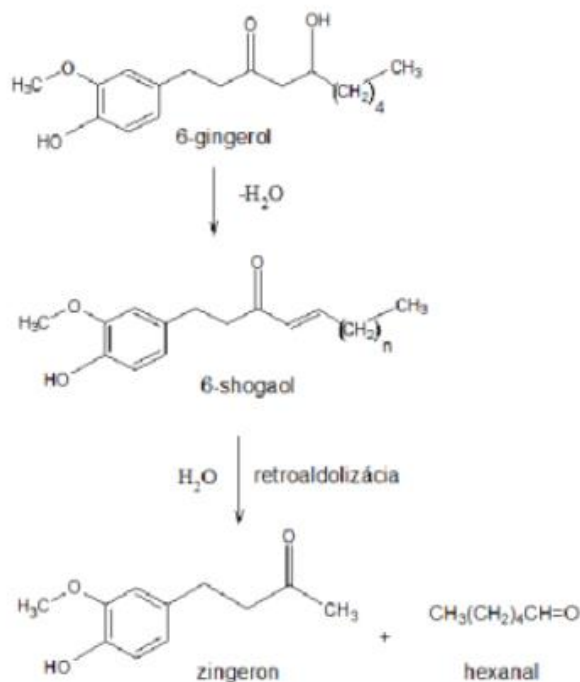
Obr. 3 Chemická štruktúra niektorých shogaolov [24].

Zingerony (Obr. 4) nie sú prítomné v čerstvom podzemku zázvoru, ale vznikajú pri dlhšom skladovaní alebo jeho tepelnými úpravami. V dôsledku premeny gingerolov na pálive zingerony dochádza k zmene arómy (Obr. 5) Zingerony majú významné antimikrobiálne a antioxidačné vlastnosti [26,27].



Obr. 4 Chemická štruktúra zingeronu [28].

Vplyvom retroaldolizácie gingerolov vzniká zingeron a príslušné alkanaly – hexanal, oktanal, dekanal. Alkanaly sú nositeľom pachutí [17, 27].



Obr. 5 Priebeh degradácie 6-gingerolu [29].

2.1.4 Vlastnosti a využitie

Zázvor je známy pre svoju nutričnú hodnotu a biologickú aktivitu, ktorú vykazujú v ňom prítomné biologicky aktívne látky. Potvrdené sú jeho protirakovinové, antioxidačné, antimikrobiálne, protizápalové, antihyperglykemické či antialergické účinky. Mnoho predklinických štúdií potvrdilo jeho pozitívny účinok pri liečbe cukrovky, obezity, alergií. Medzi nezanedbateľné vlastnosti zázvoru a jeho biaktívnych látok patria aj jeho protektívny efekt voči širokej škále biologických, chemických a žiarením indukovaných toxínov [21,30,31].

Významnú úlohu zohráva pri štúdiu liečby rakoviny, kde sa sústreďuje na jeho chemoprotektívny a chemoterapeutický efekt na rakovinové bunky a taktiež vlastnosti schopné zmierňovať vedľajšie účinky chemoterapie, či potenciál znižovať rezistenciu rakovinotvorných buniek na protirakovinové lieky. Protirakovinové účinky gingerolov a shogolov boli študované v ľudských bunkových kultúrach, kde bola dokázaná jeho efektívnosť pri terapii rakoviny vaječníkov, pľúc, pečene, kože, žalúdka, pankreasu a hrubého čreva. [32,33].

Významnú úlohu zohráva zázvor pri liečení žalúdočných problémov. Má schopnosť stimulovať produkciu slín, žlčových kyselín, žalúdočných, črevných a pankreatických štiav, čo vedie k zlepšeniu trávenia a stimuluje hlavne metabolizmus tukov. Oleoresin dráždi na teplo citlivé nervové zakončenia v ústach a žalúdočnej sliznici, čo prispieva k zlepšeniu trávenia [15,33,34].

Niekoľko štúdií na zvieratách potvrdzuje priaznivý efekt zázvoru na znižovanie hladiny cholesterolu v tele a potláčanie akumulácie tukov. Schopnosť znižovať obsah tuku v tele je prospešná pri udržiavaní hmotnosti a znižuje riziko kardiovaskulárnych ochorení. Mechanizmom účinku je schopnosť oleoresínu interferovať pri absorpcii cholesterolu [35].

Antidiabetický efekt zázvoru zahŕňa stimuláciu tvorby inzulínu a prevrat v metabolizme sacharidov a tukov. Aktívne látky zázvoru – gingeroly a shogaoly – vykazujú vlastnosti schopné znižovať sekundárne komplikácie spojené s cukrovkou a to pečenné, obličkové, očné a nervové symptómy. Extrakt zázvoru je schopný znižovať hladinu glukózy v krvi a a toleranciu voči glukóze u diabetických zvierat [15,35].

V zázvore sú prítomné proteázové enzýmy, ktoré účinkujú na zápalové aktivity. Experimentálne štúdie potvrdili schopnosť inhibície zápalových procesov inhibíciou metabolizmu kyseliny arachidonovej a taktiež inhibíciou cyklooxygenázy, lipxygenázy a tiež pôsobí ako inhibítor syntézy leukotriénov. Protizápalové vlastnosti vykazujú extrakty zázvoru voči zápalovým ochoreniam kĺbov – artritídám prostredníctvom znižovania alebo zvyšovania protizápalových/prozápalových cytokínov a aktiváciou antioxidačného obranného systému [15,35].

In vitro štúdie potvrdili schopnosť aktívnych látok zázvoru nervové bunky a naznačujú možné využitie pre liečbu Alzheimerovej choroby [6].

Mnoho štúdií taktiež potvrdilo schopnosť zázvoru účinkovať ako protijed voči veľkému množstvu rôznych toxínov ako sú pesticídy, environmentálne polutanty, ťažké kovy, radiácia, lieky, či mikrobiálne toxíny [36].

2.2 Biologicky aktívne látky

2.2.1 Fenoly

Fenolické látky sú najpočetnejšou ubikvitnou skupinou sekundárnych metabolitov rastlín. Rastliny syntetizujú fenolické látky ako odpoveď na biotický a abiotický stres, spôsobený napríklad infekciou, vodným stresom, či v dôsledku poklesu teplôt. Je to heterogénna skupina látok, pričom sú zastúpené ako vonné (jednoduché fenoly – vznik degradáciou fenolových kyselín a deriváty hydroxyfenolových kyselín), chuťové látky, či farbivá. . Fenoly bývajú málokedy nositeľmi netypických pachutí. Fenoly obsahujú aromatické jadro nesúce jeden alebo viac hydroxylových substituentov [37,38].

Medzi chuťové fenolické látky patria jednoduché fenoly alebo kondenzované triesloviny flavolany. Medzi fenolické prírodné farbivá patria niektoré chinony, lignany, flavonoidy a pod. Niektoré fenolické látky vykazujú výraznú biologickú aktivitu a správajú sa ako prírodné antioxidanty, toxické zložky potravín, alebo slúžia ako prirodzené obranné látky rastlín – fytoalexíny. Fenolové kyseliny a ich deriváty účinkujú ako primárne antioxidanty, pričom ich aktivita je ovplyvnená počtom hydroxylových skupín v molekule. Antioxidačná aktivita je tiež pripisovaná prítomnosti aromatického kruhu, ktorý je schopný stabilizovať, alebo delokalizovať nespárené elektróny vo svojej štruktúre. Prítomnosť a umiestnenie voľných hydroxylových skupín v molekule tiež spôsobuje antimikrobiálnu aktivitu fenolických látok. Mechanizmom účinku je interakcia hydroxylových skupín s bunkovou membránou baktérií, čo spôsobuje rozrušenie membránovej štruktúry a stratu bunčných komponentov [17,23,37,39].

Fenoly, ktoré sa v potravinách uplatňujú ako chuťové alebo vonné látky sa vyskytujú buď ako primárne zložky niektorých silíc, alebo vznikajú ako sekundárne produkty pri spracovaní potravín. Ich vznik je zväčša spôsobený termickým spracovaním potravín, alebo mikrobiologickou aktivitou. Vznikajú z fenolových kyselín a lignínu.

Fenolické látky vznikajúce v dôsledku metabolizmu mikroorganizmov sú vedľajšími produktmi mliečného a alkoholového kvasenia [17].

Fenolické látky môžeme rozdeliť do šiestich základných skupín:

1. Flavonoidy
2. Fenolické kyseliny
3. Fenolické alkoholy
4. Stilbeny
5. Ligniny
6. Taníny [37].

2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy sú najpočetnejšou skupinou rastlinných fenolov. V súčasnosti je známych viac ako 4000 flavonoidných látok. V molekule obsahujú dva benzénové kruhy spojené trojuhlikatým reťazcom (usporiadanie C₆-C₃-C₆). Flavonoidy sú tvorené 2-fenyl-4-benzol(H)pyran systémom, ktorý je substituovaný v rôznych pozíciách. Na všetkých troch kruhoch dochádza ku substitúcii hydroxyskupinami, alebo methoxyskupinami. Hydroxylové substituenty určujú vlastnosti flavonoidov. C₃ reťazec býva súčasťou heterocyklického pyranového kruhu. Flavonoidy sú odvodené od kyslíkovej heterocyklickej zlúčeniny flavanu, teda 2H-chromén, ktorý je v polohe C-2 substituovaný fenylovou skupinou. Flavanový kruh sa skladá z dvoch benzenových kruhov a kruhu odvodeného od 2H-pyranu [41,74].

Podľa bočného reťazca na ich B alebo C kruhu delíme flavonoidy na:

1. Flavony
2. Izoflavony
3. Flavonoly
4. Flavanoly
5. Flavanony [37].

Flavonoidy sa vyskytujú v prírode vo forme voľných látok, alebo ako glykozidy. Väčšina flavonoidov, okrem katechínov, sa vyskytujúce vo forme viazanej na sacharidy ako β-glykozidy. Prítomné sacharidy sú: D-glukóza, L-rhamanóza, L-arabinóza, D-xylóza, D-galaktóza, D-apióza, alebo D-glukurónová kyselina. Od ostatných fenolických látok sa výrazne líšia svojimi vlastnosťami, preto tvoria samostatnú skupinu [40,41].

2.2.3 Vitamíny

Vitamíny spolu s minerálnymi látkami patria medzi mikronutrienty. Tvoria heterogénnu skupinu organických látok. Ich základnou funkciou je zabezpečovanie potrebných funkcií organizmu od produkcie hormónov až po pomoc telu získavať energiu z makronutrientov (tuky, cukry, bielkoviny) prijatých z potravy. V tele zastávajú funkciu koenzýmov, teda tvoria dôležitú časť enzýmov. Často rôzne vitamíny pracujú spoločne na zabezpečení správnej funkcie chemických procesov bunky [42,43].

Vitamíny sú esenciálnymi nutrientmi. Ich prítomnosť v organizme je nevyhnutná na zabezpečenie správneho fungovania organizmu, avšak telo si ich nevie plne syntetizovať samo.

Z potravy sa vitamíny zväčša získavajú vo forme prekurzorov, ktoré je telo schopné ľahko konvertovať na vitamín [43,44].

Vitamíny delíme do dvoch skupín:

1. Vitamíny rozpustné vo vode (napr. vitamíny skupiny B, vitamín C, atď.)

Telo ich nedokáže dlhodobo skladovať v organizme, preto sú stanovené odporúčané denné dávky týchto vitamínov. Vstrebávané sú v gastrointestinálnom trakte, a odvedené do špeciálnych tkanív, kde sú aktivované. V krvi nevyžadujú špeciálne transportné molekuly a v nadbytku sú ľahko vylúčené močom. Často majú funkciu kofaktorov enzýmov [44].

2. Vitamíny rozpustné v tukoch (A, D, E, K)

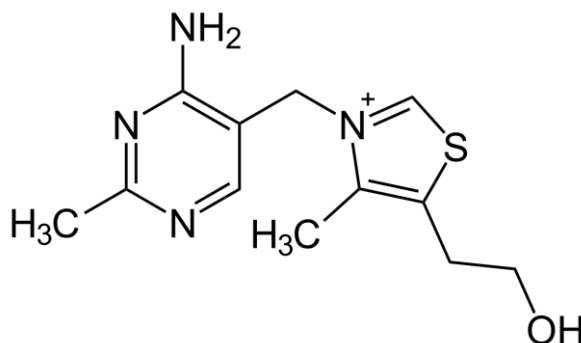
Telo je schopné si tieto vitamíny dlhodobo uchovávať. Vitamíny A a D sú uchovávané v pečeni, vitamín E je uchovávaný v tukovom tkanive a v menšom rozsahu v reprodukčných orgánoch. Pre ich vstrebávanie je nutná správna funkcia resorpcie tukov. Transport týchto vitamínov v tele je zabezpečený prostredníctvom lipoproteínov alebo pomocou špecifických proteínov [44].

Pre správnu funkciu ľudského tela je nevyhnutných 13 vitamínov a to – štyri v tukoch rozpustné vitamíny (A, D, E, K) a vo vode rozpustné vitamíny skupiny B (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂, B₁₇) a vitamín C [45].

2.2.3.1 Vitamín B₁ – Thiamín

Vitamín B₁ (Obr. 6), ako všetky vitamíny skupiny B, patrí do skupiny vo vode rozpustných vitamínov. Uplatňuje sa ako kofaktor kľúčových enzýmov v metabolizme cukrov a aminokyselín. Je nevyhnutný pre produkciu ATP, ribózy, NAD a DNA. Má kľúčovú rolu pri vzniku správne fungujúcich nervových buniek a produkcii chemických nervových signálov. Doporučená denná dávka pre dospelého človeka je – 1,2 mg/deň [46,47].

Hypovitaminóza sa prejavuje stratou apetítu, poruchami trávenia, únavou, svalovou bolesťou či stratou citlivosti alebo pocitmi bodania. Dlhodobý deficit prímu vitamínu B₁ sa môže prejavovať ochorením Beri-Beri, ktoré ovplyvňuje správnu funkciu srdca a nervového systému. Je charakteristická poruchou metabolizmu sacharidov a aminokyselín. Najčastejším dôvodom hypovitaminózy je alkoholizmus. Nadmerný príjem vitamínu B nemá žiaden toxický efekt na organizmus [45,46,47].

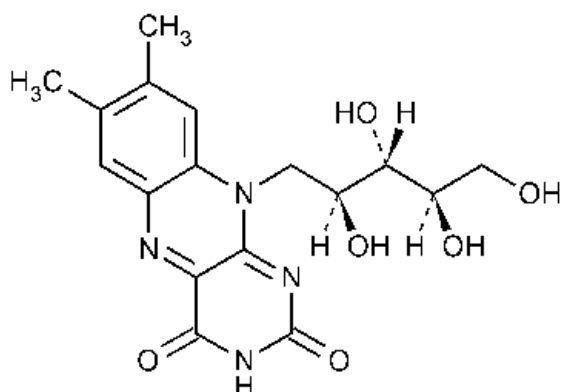


Obr. 6 Chemická štruktúra thiamínu [48].

2.2.3.2 Vitamín B2 – Riboflavín

Vitamín B₂ (Obr. 7) sa prirodzene vyskytuje ako súčasť mliečnych produktov, mäsa a vajícok. V tele pomáha rozbiť škodlivé chemické látky (napr. homocystenin) a zhasať voľné radikály. Riboflavín spolu s dvomi flavoproteínovými koenzýmami z neho derivovanými zohráva dôležitú úlohu ako limitujúci faktor vo väčšine enzymatických procesov. Sú kľúčové pri syntéze, premene a recyklovaní niacínu, kyseliny listovej a vitamínov skupiny B. Uplatňujú sa pri tvorbe hemových proteínov, transporte a ukladaní kyslíka. Odporúčaná denná dávka pre dospelého človeka je – pre muža 1,3 mg/deň, pre ženu 11 mg/deň [44,45].

Nedostatočný príjem riboflavínu môže viesť ku tvorbe prasklín a vredov v kútikoch pier a bolestiam pier, úst a jazyka [44].

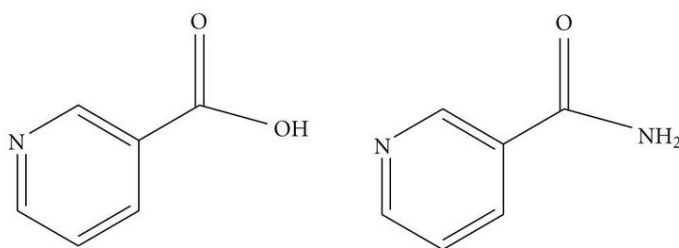


Obr. 7 Chemická štruktúra riboflavínu [49].

2.2.3.3 Vitamín B3 – Niacín

Vitamín B₃ sa do tela dostáva súbor dvoch foriem – ako niacín (kyselina nikotínová) a nikotínamid (Obr. 8). Pre ľudské telo niacín slúži ako prekursor bioaktívnych molekúl – nikotínamid adenín difosfátu (NAD) a nikotínamid adenín dinukleotid fosfátu (NADP). Tie sú dôležitými kofaktormi pre väčšinu bunkových redoxných reakcií a preto sú nevyhnutné pre bunkovú respiráciu a metabolizmus. Tiež podporuje správnu cirkuláciu v tele a pomáha redukovať cholesterol a triacylglyceroly. Doporučená denná dávka vitamínu B₃ je pre dospelého človeka – pre muža 16 mg/deň pre ženu 14 mg/deň [44].

Deficiencia sa prejavuje vznikom ochorenia pelagra. Toto ochorenia ovplyvňuje správnu funkciu pokožky, trávenia a nervového systému – spôsobuje demenciu. Môže viesť až k mentálnym ochoreniam [44,50].



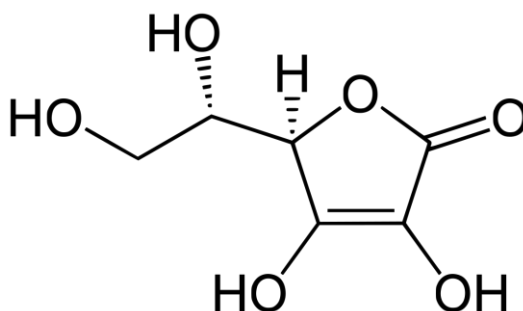
Obr. 8 Chemická štruktúra niacínu (vľavo) a nikotínamidu (vpravo) [51].

2.2.3.4 Vitamín C – kyselina L-askorbová

Vitamín C (Obr. 9) je vo vode rozpustný vitamín. V prírode sa vyskytuje len vo forme L-enantioméru. Vytvára sa v telách mnohých rastlín a živočíchov z D-glukózy a D-galaktózy. V ľudskom tele k jeho produkcii nedochádza z dôvodu absencie L-gulonolactazového oxidačného enzýmu. Vitamín C, ktorý sa v tele nespotrebuje sa denne vyplavuje v moči [52].

Hlavným významom vitamínu C v ľudskom tele sú jeho antioxidačné účinky. Nie len, že je schopný prevencie vzniku voľných radikálov, ktorá vedie ku širokej škále degeneračných ochorení ako rakovina a kardiovaskulárne ochorenia, ale taktiež má preventívnu schopnosť chrániť iné antioxidačné vitamíny (A, E) pred oxidáciou. Dôležitá je taktiež jeho funkcia pri tvorbe kolagénu, ktorý je súčasťou krvných ciev, šliach a väzov. Podieľa sa na produkcii neurotransmiterov, hojení rán a tvorbe kostí. Vo veľkom množstve je dostupný v bunkách imunitného systému, ktoré ho využívajú v prípade potreby imunitnej reakcie. Podľa The World Health Organization je doporučená denná dávka pre dospelého človeka 45mg/deň [42,43,52].

Hypovitaminóza sa môže prejavovať ochoreniami d'asien, tvorbou modrín, stratou vlasov a zubov, podráždením pokožky, pomalým hojením rán, anémiou, oslabenou imunitou a podobne. Nedostatok vitamínu C sa môže prejaviť vo forme ochorenia skorbut. Väčšina klinických prejavov skorbutu je spôsobená zmenou štruktúry kolagénu [52,53].



Obr. 9 Chemická štruktúra vitamínu C [54].

2.3 Biologická aktivita

2.3.1 Antioxidačná aktivita

Reaktívne formy kyslíka sú prirodzene produkované v cicavčích organizmoch, kde sú kompenzované vnútorným antioxidačným obranným systémom. Nadmerná produkcia voľných radikálov vedie k oxidatívne stresu, ktorý urýchľuje vznik degeneračných ochorení. Voľné radikály pôsobia na biologicky významné zlúčeniny (lipidy, bielkoviny, nukleové kyseliny) a ovplyvňujú ich základne funkcie. Tieto zmeny môžu viesť až k zmenám v štruktúre buniek, tkanív k poškodeniu orgánov a dôležitých biologických funkcií organizmu. Oxidácia polynenasýtených mastných kyselín v biologických membránach vedie k vážnym poškodeniam tkanív a vzniku ochorení ako je koronárna arteroskleróza, rakovina, či cirhóza [11,34,37,41].

Antioxidanty sú látky schopné svojou aktivitou spomaliť alebo zamedziť oxidácii lipidov a oxolabilných zlúčenín, ktoré sa v potravinách prejavujú žltnutím tukov a znehodnotením ľahko oxidovateľných zložiek (napr. vonné látky). Oxidácia tukov vyvoláva radu chemických zmien v potravine, ktoré vedú k celkovému zníženiu kvality potravín až k znehodnoteniu výživových, hygienicko-toxikologických a senzorických vlastností potraviny [34].

Z chemického hľadiska sú antioxidanty redukčné činidlá, teda molekuly, ktoré môžu prijímať elektróny a odovzdávať vodík. Ich úlohou v organizme je premieňať, zachytávať alebo inaktivovať vzniknuté voľné radikály. Okrem endogénnych nízkomolekulárnych antioxidantov (napr. koenzým Q) majú dôležitú rolu látky prírodného pôvodu vykazujúce antioxidačné vlastnosti. Medzi tieto látky radíme antioxidačné vitamíny (vitamín C, E), karotenoidy, polyfenoly (napr. flavonoidy, katechiny, fenolické kyseliny). Najviac využívanými antioxidantmi sú syntetické fenoly ako BHA [11,34,37,41,56].

Podľa pôvodu delíme antioxidanty na:

1. Prírodné
2. Syntetické [11].

Mechanizmus pôsobenia antioxidantov na organizmus:

1. Primárne antioxidanty: reakcia s voľnými radikálmi
2. Sekundárne antioxidanty: redukcia vzniknutých hydroperoxidov
3. Antioxidanty viažuce do komplexov katalyticky pôsobiace kovy
4. Antioxidanty eliminujúce prítomnosť kyslíku [41].

Pôsobenie antioxidantov prebieha jedným z nasledujúcich krokov:

1. Zachytávanie voľných radikálov
2. Potláčanie peroxidácie lipidov
3. Stimulácia aktivity endogénnych antioxidačných enzýmov
4. Inhibícia aktivity katalyzovanej syntézy oxidu dusnatého
5. Inhibícia LDL oxidácie
6. Inhibícia enzýmov metabolizmu arachidonátu [56].

2.3.1.1 Antioxidačné účinky zázvoru

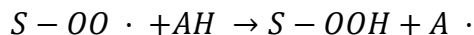
Zázvor obsahuje viac ako päťdesiat látok vykazujúcich antioxidačnú aktivitu. Patria medzi ne 6-,8-,10-gingeroly, 6-shogaol rovnako ako aj zingeron, geraniol a kurkuminoidy. Vo všeobecnosti antioxidačná aktivita flavonoidov a polyfenolov je založená na štrukturálnom vzťahu medzi jednotlivými časťami ich štruktúr. Prírodné polyfenoly sú schopné odstraňovať voľné radikály, chelátovať kovové katalyzátory, aktivovať antioxidačné enzýmy a inhibovať oxidázy [6,41,57].

Zázvor má schopnosť znižovať peroxidáciu fosfolipidových lipozómov v prítomnosti Fe^{3+} a askorbátu, kde sa uplatňuje schopnosť pôsobiť na prenos elektrónov a transfer vodíkových atómov. Druhým mechanizmom antioxidačných účinkov zázvoru je vychytávanie peroxylových radikálov, taktiež sa uplatňuje ako potencionálny inhibitor syntézy -NO vedúcej

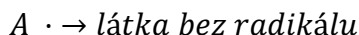
k poškodeniu DNA. Je veľmi účinným prostriedkom prevencie tvorby reaktívnych kyslíkových radikálov indukovaných ultrafialovým žiarením [16,34,41,58].

Vo všeobecnosti sa hlavný mechanizmus účinku fenolických antioxidantov skladá z dvoch krokov:

1. Krok zachytávania radikálu



2. Terminálny radikálový krok



kde S je látka, ktorá sa oxiduje, S-OO je peroxylový radikál S, AH je antioxidant a A je antioxidačný radikál.

Prvý krok zachytávania radikálov je reverzibilný proces. Druhý krok je ireverzibilný a jeho výsledkom je stabilný radikálový terminálny produkt [59].

2.3.2 Antimikrobiálna aktivita

Pojem antimikrobiálna aktivita vyjadruje schopnosť niektorých látok spomaliť, alebo úplne inhibovať rast mikroorganizmov. Táto schopnosť súvisí so zložením, štruktúrnou a funkčnými skupinami jednotlivých zložiek. Schopnosť látok vykazovať antimikrobiálnu aktivitu je tiež ovplyvnená koncentráciou antimikrobiálnej látky, zložením prostredia (obsah soli a fenolických látok), hodnotou pH, teplotou a typom mikroorganizmu. Antimikrobiálnu aktivitu vykazujú esenciálne prchavé oleje, silice, pigmenty, alkaloidy, či živica. V koreninách vykazujú najväčšiu antimikrobiálnu aktivitu fenolové zlúčeniny, ktoré obsahujú hydroxylovú skupinu [60,61,62].

Podľa pôsobenia antimikrobiálnej látky na mikroorganizmus poznáme účinky:

1. mikrobistatické (reverzibilne zastavujúce rast a rozmnožovanie mikroorganizmov)
2. mikrobicídne (ireverzibilné usmrtenie mikroorganizmov).

Ak ide o látky, ktoré ovplyvňujú a pôsobia len na baktérie, hovoríme o bakteriocídnych / baktériostatických látkach. V prípade, že ide o látky s účinkom na kvasinky a vlákňité huby nazývame ich fungicídne / fungistatické [60].

Vo všeobecnosti platí, že gramnegatívne baktérie sú odolnejšie voči pôsobeniu antimikrobiálnych látok ako grampozitívne baktérie [61].

2.3.2.1 Mikrobiálna rezistencia

Pojem rezistencia označuje schopnosť mikrobiálnej populácie odolať účinku inhibičnej koncentrácie určitej látky. Dochádza k nej v prípade, že dôjde k štruktúrnej alebo metabolickej zmene mikroorganizmu v prítomnosti antimikrobiálnej látky.

- Prirodzená rezistencia – primárna: prirodzené geneticky podmienené mechanizmy obrany niektorých druhov mikroorganizmov voči niektorým antimikrobiálnym látkam. Sú podmienené geneticky a môžu byť spôsobené absenciou cieľovej štruktúry, produkciou látok a enzýmov inaktivujúcich antimikrobiálnu látku, alebo necitlivosťou ku jej pôsobeniu.
- Získaná rezistencia – sekundárna: obranné mechanizmy si mikrobiálna populácia vytvára pri pôsobení antimikrobiálnej látky – dochádza k selekcii rezistentného

kmeňa. Môže byť podmienená geneticky (napr. spontánna mutagenéza) aj negeneticky (napr. strata špecifických cieľových štruktúr) [63,72].

2.3.2.2 Antimikrobiálne účinky zázvoru

Antimikrobiálna aktivita zázvoru je pripisovaná najmä veľkému obsahu polyfenolových zlúčenín – gingerolov a shoagolov. Extrakt z koreňa zázvoru má v závislosti od koncentrácie a extrakčného činidla inhibičný efekt na gramnegatívne bakteriálne druhy: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* a kvasinku *Candida albicans*. Etanolvý extrakt zázvoru (200 µg/mL) vykazuje antibakteriálnu aktivitu voči gramnegatívnemu rodu baktérii *Enterobacter sp.* a *Proteus sp.*, rovnako ako aj voči grampozitívnemu druhu *Staphylococcus aureus*. Najsilnejší antimikrobiálny efekt etanolového extraktu bol zaznamenaný pre gramnegatívny druh *Bacillus subtilis* [64].

Vo všeobecnosti zázvor vykazuje silnejšie antifungálne ako antimikrobiálne vlastnosti. Zázvorový extrakt jediným rastlinným extraktom schopným aktívne inhibovať rast mikroskopickej huby *Rhizopus sp.* Taktiež aktívne inhibuje rast niektorých druhov rodu *Candida*. Najsilnejšie fungicídne vlastnosti vykazujú v ňom prítomné látky – 6-, 8-, a 10-gingeroly a 6-gingerdiol [4,65,66].

2.4 Základné stanovenia biologickej aktivity

2.4.1 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Pretože existuje veľké množstvo mechanizmov účinku antioxidantov bolo potrebné vyvinúť niekoľko druhov metód. Väčšina metód, ktoré sa využívajú na meranie antioxidačných vlastností látok sa zakladajú na rovnakom princípe – schopnosti biologickej vzorky vyhľadať alebo redukovať redoxne aktívne látky v prítomnosti synteticky farbeného radikálu alebo redoxne aktívnej látky. Výsledok sa stanovuje spektrofotometricky, využitím vyhovujúceho štandardu na kvantifikáciu antioxidačnej kapacity [55,67].

Pri hodnotení účinnosti antioxidantov je dôležité uvedomiť si, že rastlinné materiály obsahujú látky, ktoré podliehajú metabolickým zmenám v gastrointestinálnom trakte a ich účinok je ovplyvnený mierou resorpcie, absorpcie, distribúcie, metabolizmu či skladovania a vylučovania. Preto účinnosť antioxidantov v podmienkach in vitro môže byť odlišná v podmienkach in vivo. Mnoho rastlinných materiálov, ktoré vykazujú účinky v testoch prebiehajúcich in vivo však nie je možné terapeuticky využiť. Dôvodom je interferencia s fyziologickými a farmakologickými procesmi prebiehajúcimi v organizme [55,67,68].

2.4.1.1 Metódy založené na eliminácii radikálov

Tento druh metód je založený na schopnosti látky vychytávať voľné radikály, ktoré sa do zmesi pridávajú, alebo v sú v nej priamo generované. Zvláštnu skupinu tvoria metódy vyhodnocujúce schopnosť inhibovať lipidickú peroxidáciu [55,69].

- Metóda ABTS·

Metóda je založená na schopnosti látok zhášať modro zelený kation-radikál ABTS.⁺. Výsledná hodnota antiradikálovej aktivity je porovnávaná s antiradikálovou aktivitou syntetického Troloxu. Antioxidant plní funkciu donoru vodíka a jeho účinnosť sa vyhodnocuje spektrofotometricky, monitorovaním poklesu absorbancie v dôsledku zmien absorčného spektra ABTS.⁺ [55,69].

Metóda sa môže aplikovať na štúdium antioxidačnej aktivity vo vode rozpustných, rovnako ako aj v tukoch rozpustných antioxidantov, čistých látok a extraktov potravín [69].

- **Metóda využívajúca DPPH**

Metóda spočíva v reakcii testovanej látky s fialovým radikálom DPPH[•] (difenylpikrylhydrazyl). Výsledkom reakcie je redukcia radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Vyhodnotenie reakcie prebieha spektrometricky pri vlnovej dĺžke 517 nm. Sleduje sa úbytok absorbancie v závislosti na čase, ku ktorému dochádza v dôsledku úbytku sfarbenia DPPH[•] redukovaného kationu pôsobením antioxidantu. Nevýhodou metódy je, že sa prirodzene nevyskytuje v biologických systémoch [37,55,70].

2.4.1.2 Metódy hodnotiace elimináciu kyslíkových radikálov

Ide o metódy, kde antioxidanty a substrát súperia o tepelne generované peroxylové radikály.

- **Metóda ORAC**

Metóda ORAC – oxygen radical absorbance capacity – prebieha v systéme, v ktorom sú generované kyslíkové radikály. Princípom je monitorovanie chemickej zmeny rozpadu fluorescenčnej látky (β -fykoerytrínu, fluoresceín) v prítomnosti antioxidantov v prostredí oxidačného činidla. Vyhodnotenie účinnosti prebieha pomocou merania úbytku fluorescencie. Výhodou metódy je, že ide fyziologicky príbuznú metódu [37,55,67].

2.4.1.3 Metódy hodnotiace schopnosť inhibovať lipidickú peroxidáciu

Antioxidačné látky, ktoré potláčajú lipidickú peroxidáciu sú schopné eliminovať iniciačné kyslíkové radikály (OH^{\bullet}) aj sekundárne vznikajúce medziprodukty (alkoxyly a peroxyly). Niektoré majú taktiež schopnosť chelátovať ióny prechodných kovov. Medzi najzakladanejšie testy patria metódy detekujúce prítomnosť produktov peroxidácie kyseliny linolovej. Produkty reakcie sú stanovené spektrofotometricky pri 234nm [55].

2.4.1.4 Metódy posudzujúce redoxné vlastnosti látok

Princípom je schopnosť neenzýmových antioxidantov vystupovať ako redukčné činidlá, ktoré reagujú s oxidantmi. Dochádza k redukcii oxidantov a následnej inhibícii oxidácie. Účinnosť antioxidačnej aktivity posudzujeme na základe redukčných schopností látky [55].

2.4.2 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

2.4.2.1 *Dilučné metódy*

Dilučné metódy sa využívajú na kvantifikáciu a stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC). Taktiež jedným z využití dilučných metód je prostredníctvom sériového riedenia odhadnúť koncentráciu mikrobiálnej populácie neznámej vzorky, spočítaním počtu kolónií z kultivovaných zo sériových riedení vzorky. Hodnota MIC vyjadruje najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky, pri ktorej ešte nie je možné pozorovať mikrobiálny rast. Zvyčajne sa vyjadruje v mg.l^{-1} . Určenie hodnoty MIC zohráva dôležitú úlohu pre určenie terapeutické dávky antimikrobiálneho činidla [71,72,76].

- Agarová dilučná technika

Je pracná a ekonomicky náročná technika, ktorá sa vykonáva na agarovom živnom médiu – agar Mueller-Hinton. Pripraví sa séria živných médií s rôznou koncentráciou požadovanej antimikrobiálnej látky a následne sa na ich povrch nanáša inokulum vyšetrovanej mikrobiálnej kultúry. Prípadne sa mikrobiálna kultúra pridá do živného média pred stuhnutím, čím sa zabezpečí rast kolónie v celom objeme. Vo výsledku sa hodnotí nárast mikrobiálnej kolónie na platniach. Táto metóda sa využíva na kontrolu spoľahlivosti ostatných techník [72,75].

- Bujónová dilučná technika

Rozlišujeme makrodilučnú a mikrodilučnú bujonovú metódu. Pri makrodilučnej metóde prebieha experiment v zkušavkách s objemom väčším ako 1ml. Mikrodilučná metóda prebieha v mikrotitračnej doštičke (objem 0,1 ml) obsahujúcej tekuté živné médium, do ktorého je pridaná antimikrobiálna látka riedená dvojnásobnou riediacou radou. Po pridaní inokula testovaného mikroorganizmu prebieha inkubácia. Následne sa vyhodnotí hodnota MIC, teda najnižšia koncentrácia látky pri ktorej nevznikol zákal ani sediment. Vyhodnotenie prebieha vizuálne, turbidimetricky, spektrofotometricky, alebo pomocou priameho stanovenia buniek [72].

2.4.2.2 *Difúzne metódy*

Difúzne metódy patria medzi semikvantitatívne metódy a nachádzajú uplatnenie zväčša pri základnom screeningu citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálnu látku. Využíva sa najmä pri stanovovaní citlivosti u rýchlo rastúcich a nenáročných baktérií. Princípom metód je meranie veľkosti inhibičných zón v okolí antimikrobiálnych látok.

- Disková difúzna metóda

Disková difúzna metóda je jedna z klasických mikrobiologických metód, založená na fyzikálno-chemickom princípe difúzných prechodov antimikrobiálnej látky živným médiom v závislosti od rastu mikrobiálnej kolónie. Patrí medzi jednu z najpoužívanejších metód stanovovania antimikrobiálnej rezistencie, keďže je efektívna, pohodlná a nízkonákladová. Antimikrobiálna látka vytvára pri prestupe agarom dynamicky sa meniaci gradient koncentrácie, čo vedie k vzniku inhibičných zón. Meranie prebieha na základe merania veľkosti inhibičných zón v okolí disku obsahujúceho antimikrobiálnu látku. Okraj inhibičnej zóny vzniká v bode, kedy je ešte koncentrácia antimikrobiálnej látky schopná inhibovať rast a rozmnožovanie mikroorganizmu. Výhodou tejto metódy je, že nepotrebuje žiadne špeciálne

vybavenie. Je však potrebné dohliadať na niekoľko kritických bodov, ako je vhodnosť živného média, objem a vlhkosť agaru, inkubačné podmienky, či správna hustota inokula [72,77].

- E-test

E-test sa radí medzi gradientové dilučné metódy, kombinujúc princípy agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy. E-test je plastový prúžok, kde na spodnej hrane je nanosený imobilizovaný diskontinuálny koncentračný gradient danej antimikrobiálnej látky. Gradient sa kalibruje podľa odpovedajúcej hodnoty MIC. Antimikrobiálna látka voľne difunduje do agaru, čím sa vytvára gradient difúzie pozdĺž pásika. Hodnota MIC sa následne odčíta z mierky na prúžku v mieste, kde končí inhibičná zóna danej látky [73,78].

3 Experimentálna časť

3.1 Zoznam použitých prístrojov

Autokláv – Vaposteri BMT, Brno

Automatické mikropipety – Biohit Proline, HTL Poľsko

Biologický inkubátor P 100-U, Biotech Praha

Laboratórne váhy – KERN, EMB, spol. s. r. o., Kyjov

Mikropipety Biohit Proline

Spektrofotometer – UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglicko

Sušiareň – Binder, Nemecko

Vortex – Reax Top, Heidolph, Nemecko

Laboratórne váhy – KERN, EMB, spol. s. r. o., Kyjov

3.2 Zoznam použitých chemikálii

ABTS (Sigma – Aldrich Chemie GmbH)

Destilovaná voda

Dusitan sodný (PENTA)

Ethanol 96 % (VWR)

Ethanol 96 % pre UV-VIS (VWR)

Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma – Aldrich Chemie GmbH)

Hydroxid sodný (LACHEMA)

Chlorid hlinitý (PENTA)

Katechín (LACHEMA)

Kyselina gallová (PENTA)

Nutrient Agar No. (HIMEDIA)

Trolox (Sigma – Aldrich Chemie GmbH)

Uhličitan sodný (LACHEMA)

3.3 Zoznam analyzovaných vzoriek

V diplomovej práci boli k experimentu použité vzorky z obchodného reťazca: čerstvý zázvor pôvodom z Číny, mletý zázvor značky Kotányi a zázvor bylinný čaj BIO.



Obr. 10 Použité vzorky zázvoru – z ľavej strany: čerstvý zázvor, koreninový prípravok značky Kotányi a BIO 100% zázvorový čaj značky Sonnentor

3.4 Príprava vzoriek

Vzorky čerstvého zázvoru boli pripravené olúpaním podzemku zázvoru a jeho následným nastrúhaním na kuchynskom strúhadle. Následne bol stanovený obsah sušiny. Vzorka čerstvého zázvoru s prídavkom 10 ml 96% etanolu sa sušila pri teplote 105 °C do konštantnej hmotnosti. V 10 g čerstvého zázvoru sa nachádza 0,5526 g sušiny. Navážka čerstvého zázvoru bola 18 g a následne prepočítaná na hmotnosť 180 g, ktorá predstavuje hmotnosť sušiny 10 g.

Odobraté vzorky macerátov a výluhov boli následne uchovávané v mrazničke pri teplote -4 °C

Získané výsledky boli následne prepočítané na rovnakú hodnotu dehydratačného faktora, na základe informácií získaných od firmy Kotányi a Sonnentor

Vychádzala som zo vzorca pre výpočet dehydratačného faktora: [79]

$$\text{dehydratačný faktor} = \frac{1}{\left[1 - \frac{(\%H_2O)}{100}\right]}$$

3.5 Príprava extraktov

3.5.1 Príprava vodných a etanolových výluhov

Návažky 10 g vzoriek Sonnentor a Kotányi a 18 g čerstvého zázvoru boli pripravené do sklených sterilných fľašiek. K vzorkám bolo následne pridaných 100 ml a 180 ml (pre vzorku čerstvého zázvoru) destilovanej vody zohriatej na teplotu 100 °C a v druhej sérii 100 ml 96% etanolu. Z výluhov boli následne odoberaté vzorky v časovom intervale 5 minút po dobu 30 min.

3.5.2 Príprava macerátov

Návažky 10 g vzoriek Sonnentor a Kotányi a 18 g čerstvého zázvoru boli pripravené do sklených sterilných fľašiek. K vzorkám bolo následne pridaných 100 ml a 180 ml (pre vzorku čerstvého zázvoru) roztoku etanolu o rôznej koncentrácii a laboratórnej teplote. Boli pripravené maceráty o koncentrácii 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % a 96 %. Maceráty boli uchované v tme pri laboratórnej teplote po dobu 96 h bez prístupu kyslíka. Vzorky boli odoberané v intervale 24 h.

3.6 Zoznam použitých mikroorganizmov

Na testovanie antimikrobiálnych vlastností analyzovaných vzoriek zázvoru som vo svojej práci využila štyri mikroorganizmy. Testovaný boli tri druhy grampozitívnych baktérií – *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* a jedna gramnegatívna baktéria – *Serratia marcescens*. Všetky testované baktérie pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne.

3.6.1 Charakteristika použitých mikroorganizmov

Podľa zloženia bunkovej steny rozoznávame dva typy baktérii – gramnegatívne a grampozitívne baktérie. Spoločnou črtou oboch typov bunkovej steny je hlavná spevňujúca zložka peptidoglykán, zložený z dvoch aminocukrov, N-acetylglukózamínu a jeho 3-O-D-laktylderivátu nazývaného kyselina N-acetylmuramová. Na každú jednotku kyseliny N-acetylmuramovej je naviazaný krátky peptidový reťazec. Gramnegatívne baktérie sa od grampozitívnych líšia zastúpením aminokyselín v tomto reťazci. Pevnosť steny je spôsobená krížovými väzbami medzi lineárnymi reťazcami polysacharidov. U grampozitívnych baktérií je vrstva peptidoglykánu hrubšia a prestupujú cez ňu lineárne reťazce teichových kyselín, ktoré nie sú prítomné v bunkových stenách gramnegatívnych baktérií. Cez Pevnejšia je pri grampozitívnych baktériách, ktoré majú hustejšiu sieť polysacharidov. Bunková stena grampozitívnych baktérií neobsahuje lipidy a bielkoviny. Naopak bunková stena gramnegatívnych baktérií obsahuje menšie množstvo peptidoglykánu, avšak sú vo veľkej miere zastúpené lipidy a proteíny. Lipopolysacharidická membrána na povrchu gramnegatívnych baktérií tvorí prirodzenú bariéru pre antimikrobiálne látky [80,81].

Serratia marcescens patrí medzi gramnegatívne, fakultatívne anaeróbne, nesporulujúce baktérie, formujúce kolónie sfarbené do červena, či ružova. Bunky sú tyčinkovité so zaoblenými koncami o priemere 0,5–0,8mm a dĺžke 0,9–2 mm. Pohybujú sa pomocou bičíka. Prirodzene sa vyskytuje v pôde, vode, vo vzduchu a na rastlinách a živočíšnych organizmoch.

S. marcescens sa podieľa na kazení potravín a to zväčša potravín s vyšším obsahom škrobov, ktoré sú vhodným substrátom na jej rast. Patrí medzi podmienené patogény, ktoré môžu spôsobovať ochorenia u ľudí a zvierat. Patrí medzi pôvodcov nemocničných nákaz a spôsobuje ochorenia dýchacích, močových ciest, sepsu, či infekcie rán [82,83].

Z priemyselného hľadiska sa *S. marcescens* využíva na fermentačnú produkciu niektorých enzýmov [84].

Druh *Bacillus subtilis* je grampozitívny endosporulujúci druh bežne sa vyskytujúci v pôde, vode a na rastlinných substrátoch. Produkované endospóry sú vysoko rezistentné voči nedostatku živín a environmentálnemu stresu. Vo všeobecnosti sa radí medzi aeróby, ale je schopný rásť aj v anaeróbných podmienkach využívajúc nitráty, alebo nikrity ako elektrón akceptory [85].

Schopnosť rásť v anaeróbných podmienkach vedie ku kazeniu potravín, napríklad chleba, málo kyslých konzerv alebo zeleniny. Schopnosť formovať polyméry glukózy a sacharózy spôsobuje pri kontaminácii problémy z rafináciou cukrov. Na druhej strane produkuje veľké množstvo rôznych sekundárnych metabolitov zo širokým spektrom antibiotických vlastností. Uplatňuje sa ako kontrolný agent rastlinných patogénov, či potravinársky konzervant [82,86].

B. subtilis rastie v rozmedzí pH 4,5–8,5 s optimom pri pH 6–7,5. Patrí medzi pohyblivé druhy tvoriace biofilm. Tvorba biofilmu zabezpečuje ochranu pred vplyvom antimikrobiálnych látok [80,87].

Bacillus cereus patrí medzi grampozitívne, tyčinkovité, sporulujúce baktérie. Bežne sa vyskytuje v pôde a potravinách. Najčastejšie kontaminuje mliečne produkty, mäso, ryžu, koreniny a cereálie. Konzumovanie nesprávne uchováanej varenej ryže je jedným z hlavných dôvodou spôsobujúcich alimentárne ochorenia. Spóry tejto baktérie sú schopné prežívať drsné

podmienky, sušenie a taktiež proces pasterizácie. *B. cereus* patrí medzi baktérie produkujúce mikotoxíny [82,88,89].

Optimálna teplota rastu je 28–35 °C s minimom pri 4–5 °C a maximom pri 48 °C. Je schopná rásť pri širokom pH rozpätí 4,9–9,3 a koncentrácii solí do 7,5 % [82].

Micrococcus luteus patrí medzi striktné aeróbne žlté-pigmentované nepohyblivé bakteriálne koky. Koky majú v priemere 0,5–3,5 µm formujúce sa do tetraedrických a nepravidelných zhlukov. *M. luteus* patrí medzi nesporulujúce baktérie. Prirodzene sa vyskytuje v pôde, vode a ako súčasť pokožkovej mikroflóry človeka. V potravinách bol izolovaný z mlieka, kuracieho mäsa a kozieho syru [90,91,92].

M. luteus spôsobuje infekčné ochorenia kože, eptickú artritídu, či meningitídu [93].

Schopnosť viazať niektoré kovy a premieňať ich na menej toxické produkty sa využíva pri štúdiu a aplikácii v bioremeditácii odpadových vôd [94].

3.7 Príprava kultivačného média

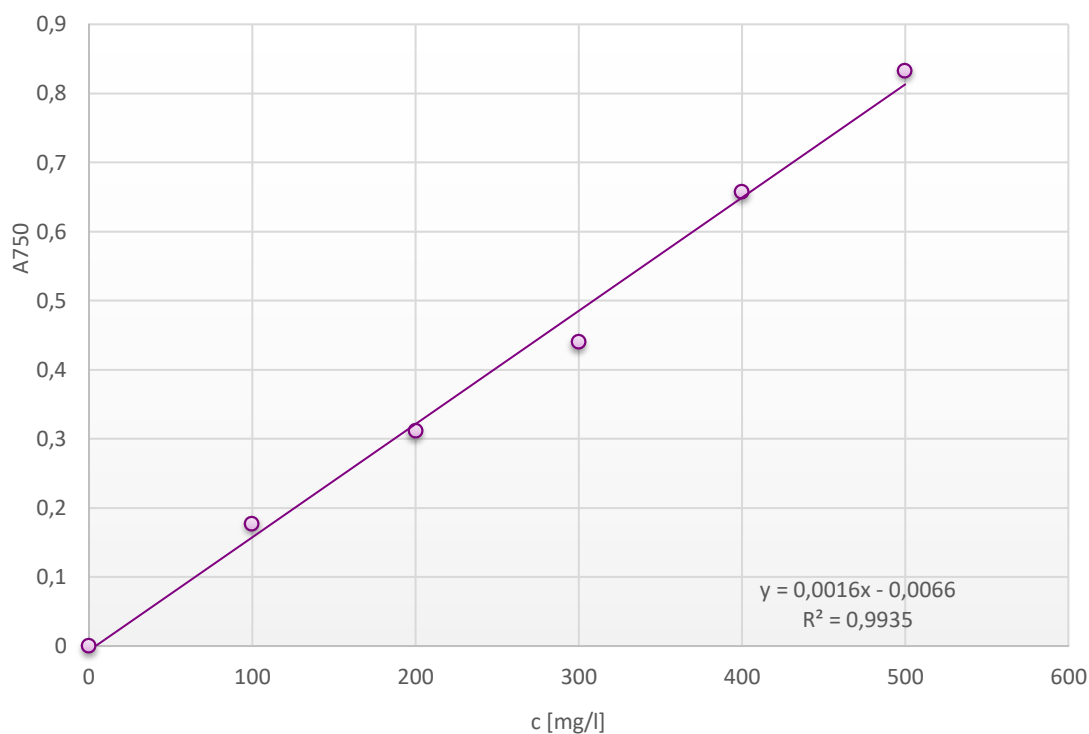
Kultivačné médium bolo pripravené použitím Nutrient agaru No. 2 (HIMEDIA). Do 1500 ml destilovanej vody bolo pridané 60 g agarového prípravku. Živné médium bolo sterilizované v autokláve po dobu 15 min pri teplote 121 °C.

3.8 Stanovenie celkových polyfenolov spektrofotometricky

Na stanovenie celkového obsahu polyfenolov vo vzorkách som použila spektrofotometrické stanovenie využitím Folin-Ciocalteuovho činidla. Prvým krokom bolo pripravenie nasýteného roztoku uhličitanu sodného (29,4 g Na₂CO₃ na 100 ml H₂O) a Folin-Ciocalteuovo činidlo pripravené v pomere 1:9.

Do skúmavky bolo napipetované 1 ml pripraveného roztoku Folin-Ciocalteuovho činidla, 1 ml destilovanej vody a 100 µl extraktu vzorky. Skúmavka s roztokom sa premieša a nechá odstáť 5 min. Následne je pridaný 1 ml nasýteného roztoku Na₂CO₃ a obsah je opäť dostatočne premiešaný. Po 15 min je stanovená absorbanca roztoku pomocou UV/VIS spektrofotometra pri vlnovej dĺžke $\lambda = 750$ nm oproti slepému roztoku. Slepý roztok sa pripraví rovnakým spôsobom, kde miesto 100 µl extraktu vzorky sa pridá 100 µl destilovanej vody.

Obsah celkových polyfenolov sa následne vyhodnotí dosadením získanej absorbancie vzorky do kalibračnej rovnice pre roztok kyseliny gallovej (Obr. 11) v rozmedzí koncentrácií 100 až 500 mg/ml.



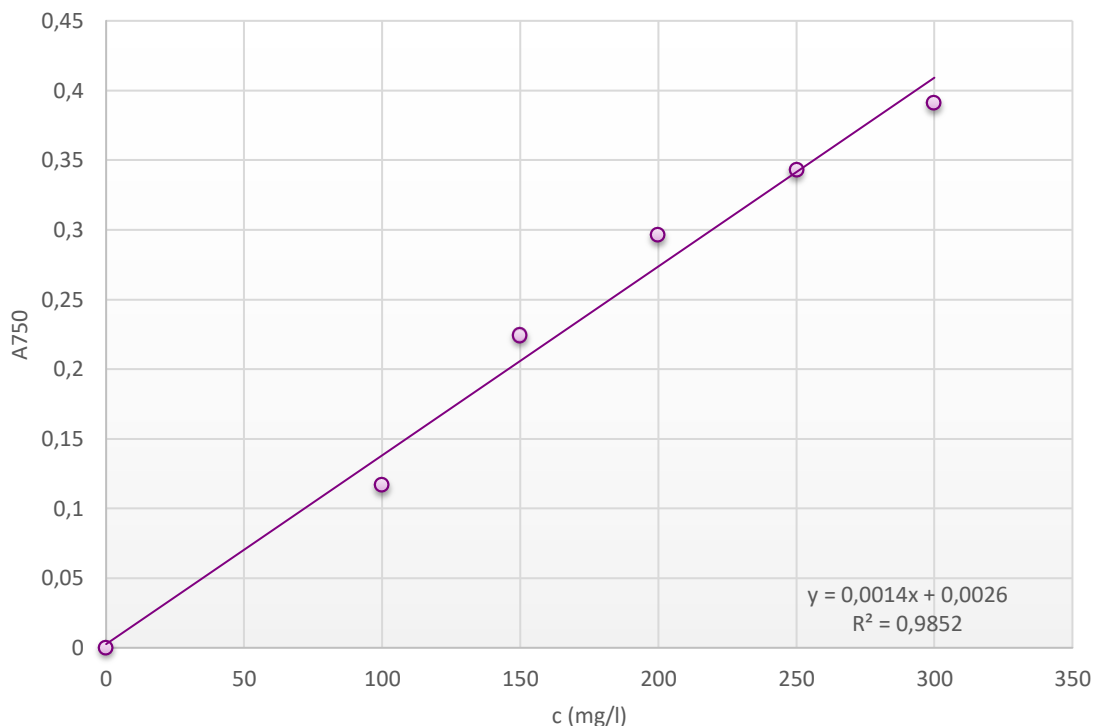
Obr. 11 Kalibračná krivka kyseliny gallovej

3.9 Stanovenie celkových flavonoidov spektrofotometricky

Stanovenie celkového množstva flavonoidov v prírodných extraktoch prebiehalo spektrofotometricky pomocou reakcie s hlinitou soľou a dusitanom.

Do skúmavky bolo napipetované 0,5 ml centrifugovaného extraktu vzorky, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Roztok sa dôkladne premieša a nechá odstáť 5 min. následne sa pridá 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného (1 mol/l) a 1 ml destilovanej vody. Po dôkladnom premiešaní sa roztok opäť nechá odstáť po dobu 15 min a následne je analyzovaný pomocou UV/VIS spektrofotometra pri vlnovej dĺžke $\lambda=510$ nm. Ako slepý roztok sa použije 4,4 ml destilovanej vody a 0,5 ml extraktu vzorky.

Celkové množstvo flavonoidov sa následne vyhodnotí dosadením získanej absorbancie vzorku do kalibračnej rovnice katechínu (Obr. 12). Kalibračná krivka katechínu bola zostrojená pre koncentrácie katechínu: 100, 150, 200, 250, 300 mg/ml.



Obr. 12 Kalibračná krivka katechínu

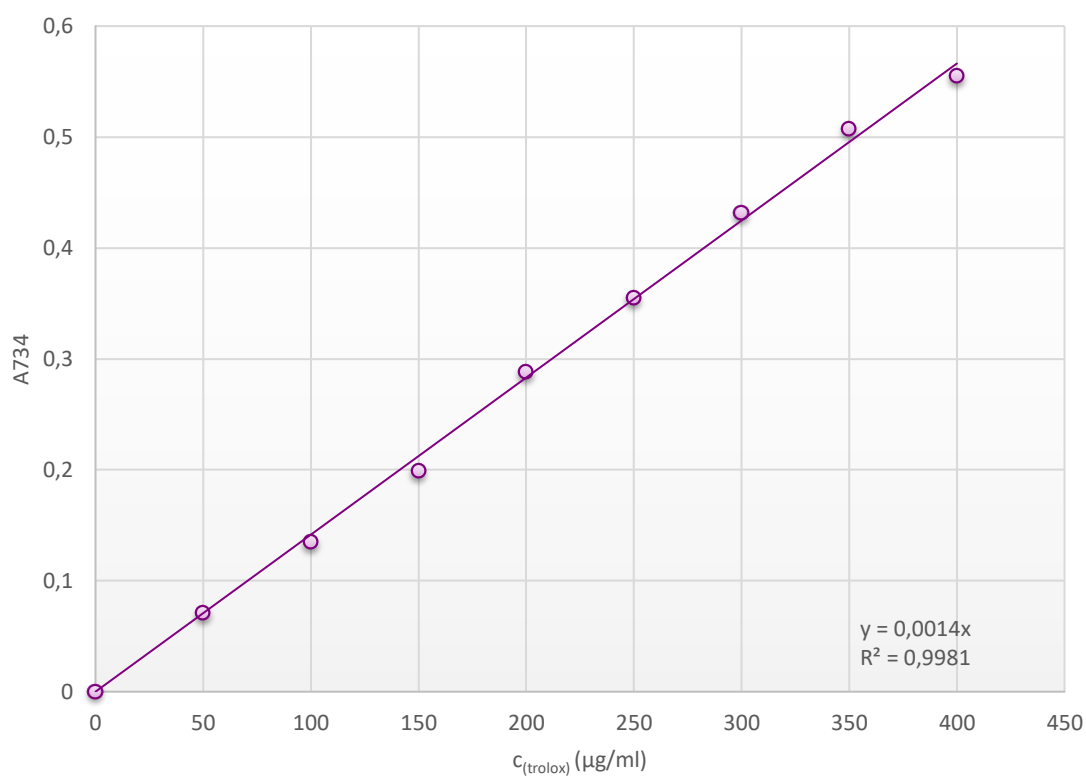
3.10 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity pomocou ABTS· spektrofotometricky

Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity pomocou ABTS· prebieha na základe zhášania ABTS· radikálu antioxidantom.

Prvým krokom je príprava vodného roztoku ABTS· o koncentrácii 7mM. Radikálový katión sa získa z ABTS reakciou s 2,45 mM peroxidisíranom draselným. Takto pripravený roztok sa ponechá pri laboratórnej teplote v tme po dobu najmenej 12 h.

Odstátý roztok ABTS· sa zriedi etanolom pre UV/VIS spektrofotometriu na absorbanciu $A=0,7 \pm 0,02$ pri vlnovej dĺžke $\lambda=734$ nm merané oproti etanolu pre UV/VIS. Do zúženej kyvety bol napipetovaný 1 ml ABTS· a bola zmeraná jeho absorbancia v čase t_0 . Následne bol pridaný 10 μ l extraktu vzorky. Roztok sa nechal odstáť 10 min v tme a následne bol zmeraný pokles absorbancie v čase t_{10} .

Celková antioxidačná aktivita bola následne vyhodnotená pomocou kalibračnej krivky Troloxu (Obr. 13) rozpusteného v 60% etanole v rozmedzí koncentrácií 50–400 μ g/ml.



Obr. 13 Kalibračná krivka Troloxu

3.11 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Na overenia antimiakrobiálnej aktivity zázvorových extraktov bola využitá jamková difúzna metóda. 1 ml bujónu s 24 h mikrobiálnou kultúrou bol napipetovaný do 150 ml sterilizovaného živného média. Živné médium bolo následne rozliate do Petriho misiek. Do stuhnutého vychladeného živného média v Petriho miskách boli pomocou korkorytu vyhlbené štyri jamky. Do jednej jamky bol pridaný 100 µl kontrolného roztoku rozpúšťadla (voda/etanol). Do zvyšných troch jamiek bolo napipetovaných 100 µl sledovaného zázvorového extraktu. Kultivácia prebiehala pri teplote 27 °C po dobu 72 h. Následne bola antimikrobiálna aktivita vyhodnotená na základe vzniknutých inhibičných zón v okolí jamiek.

4 Výsledky a diskusia

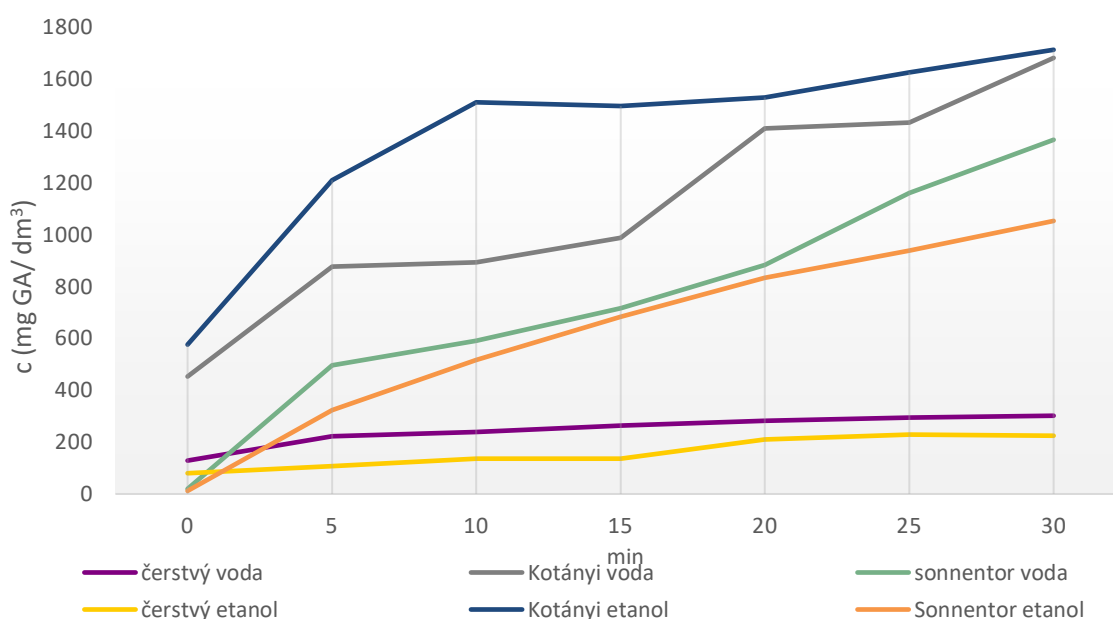
Cieľom diplomovej práce bolo stanovenie a analýza obsahu bioaktívnych látok v sérii extraktov zo zázvoru a analýza vplyvu použitého druhu vzorky, rozpúšťadla a postupu prípravy na ich obsah a vlastnosti.

Pripravená bola séria etanolových a vodných výluhov a macerátov, ktoré slúžili ako vzorky pre stanovenie celkového obsahu polyfenolov a flavonoidov. Následne som stanovila pre jednotlivé vzorky antioxidačnú aktivitu. Pre vzorky výluhov a macerátov, ktoré vykazovali najvyššiu antioxidačnú aktivitu som následne testovala potencionálny antimikrobiálny účinok voči vybraným bakteriálnym druhom. Testované boli tri grampozitívne druhy baktérií – *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* a gramnegatívna baktéria *Serratia marcescens*.

Dokopy bolo pripravených 24 extraktov, z ktorých bolo následne odobraných 132 vzoriek na analýzu. Analyzovaný bol podzemok čerstvého zázvoru, sušený koreninový prípravok – sušený zázvor od firmy Kotányi, a bio zázvorový čaj obsahujúci 100% zázvoru od firmy Sonnentor.

4.1 Stanovenie celkových polyfenolov

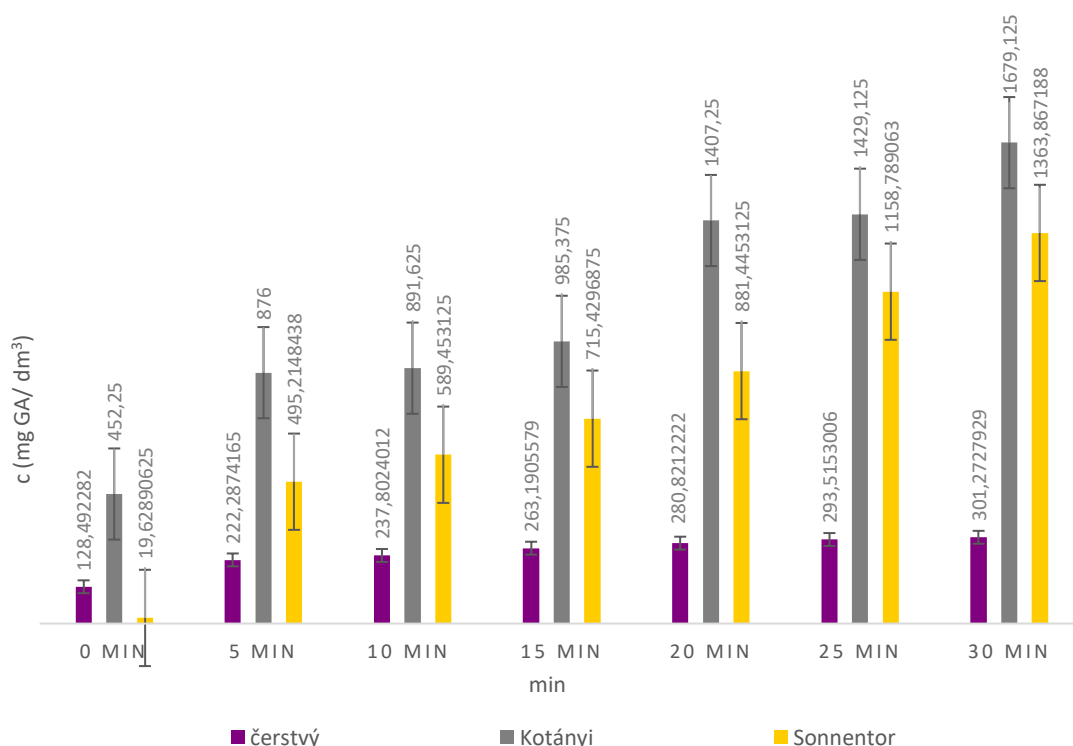
Stanovenie celkového obsahu polyfenolov vo vzorkách zázvoru bolo uskutočnené spektrofotometricky využitím Folin-Ciocalteuho činidla. Meranie prebiehalo pri vlnovej dĺžke 750nm. Princípom metódy je meranie absorbancie po redukcii fenolových látok vo vzorke za vzniku modrého sfarbenia. Pre každú vzorku sa meranie opakovalo trikrát a pre následnú analýzu bola použitá priemerná hodnota výsledkov meraní. Výpočet obsahu polyfenolových látok v zázvore vychádza z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky pre kyselinu gallovú. (Obr. 11) Koncentrácia polyfenolov v jednotlivých vzorkách je vztiahnutá na mg kyseliny gallovej v dm^3 .



Obr. 14 Extrakčné krivky polyfenolov vo vodných a etanolových výluhoch vzoriek zázvoru

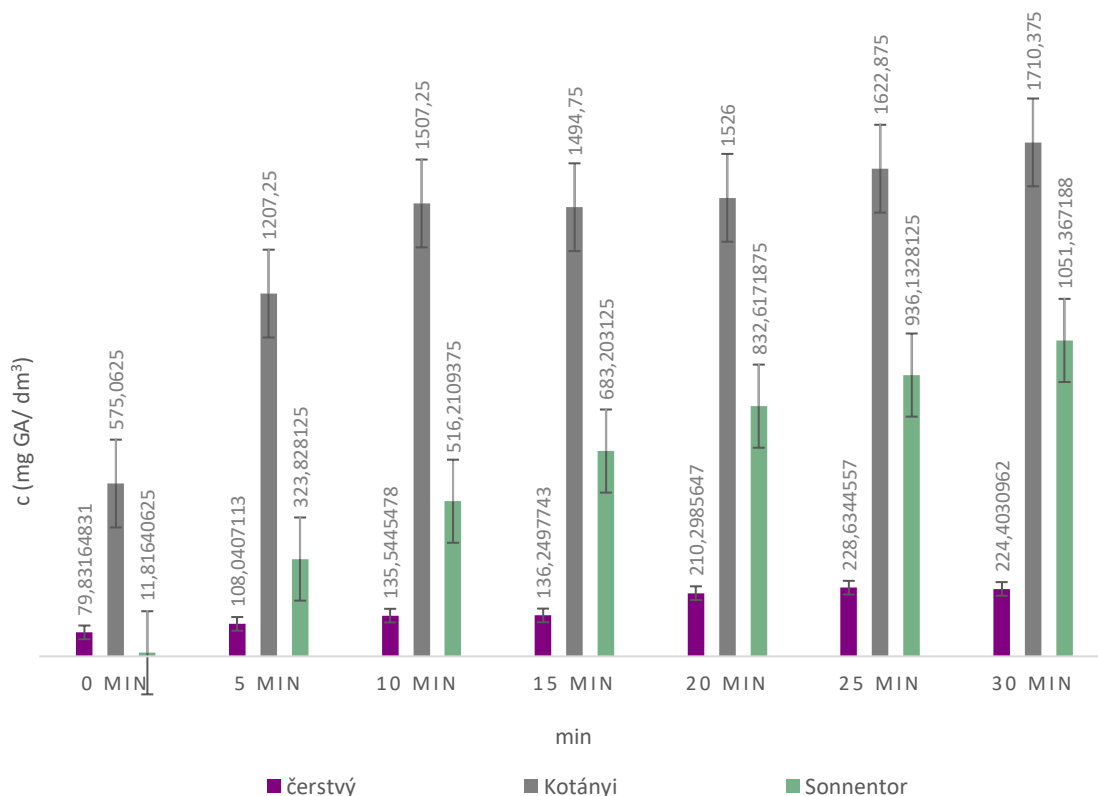
Obrázok č. 14 zachytáva závislosť obsahu polyfenolických látok v jednotlivých vzorkách etanolových a vodných výluhov na čase. Z obrázku č. 14 vyplýva, že najväčší obsah polyfenolov bol v etanolovom extrakte sušeného zázvoru značky Kotányi. Najnižší obsah polyfenolov bol zaznamenaný v etanolovom výluhu čerstvého zázvoru. Pre výluhy Bio čaju značky Sonnentor a výluhu čerstvého zázvoru sa ukázalo ako vhodnejšie extrakčné činidlo voda.

Zo získaných kriviek môžeme pozorovať, že vylučovanie polyfenolov z čerstvého zázvoru prebiehalo vo vodnom aj etanolom činidle zo zvyšujúcim sa časom približne konštantne a rozdiel koncentrácií v 0 min a 30 min nebol taký výrazný ako pri vzorkách sušeného zázvoru. Pri vzorke značky Sonnentor môžeme pozorovať, že ku extrakcii polyfenolov nedošlo hneď po zaliatí extrakčným činidlom. Môžeme konštatovať, že koncentrácia polyfenolov vo všetkých stanovovaných vzorkách rástla so zvyšujúcim sa časom extrakcie.



Obr. 15 Koncentrácie polyfenolov vo vodných výluhoch vzoriek zázvoru

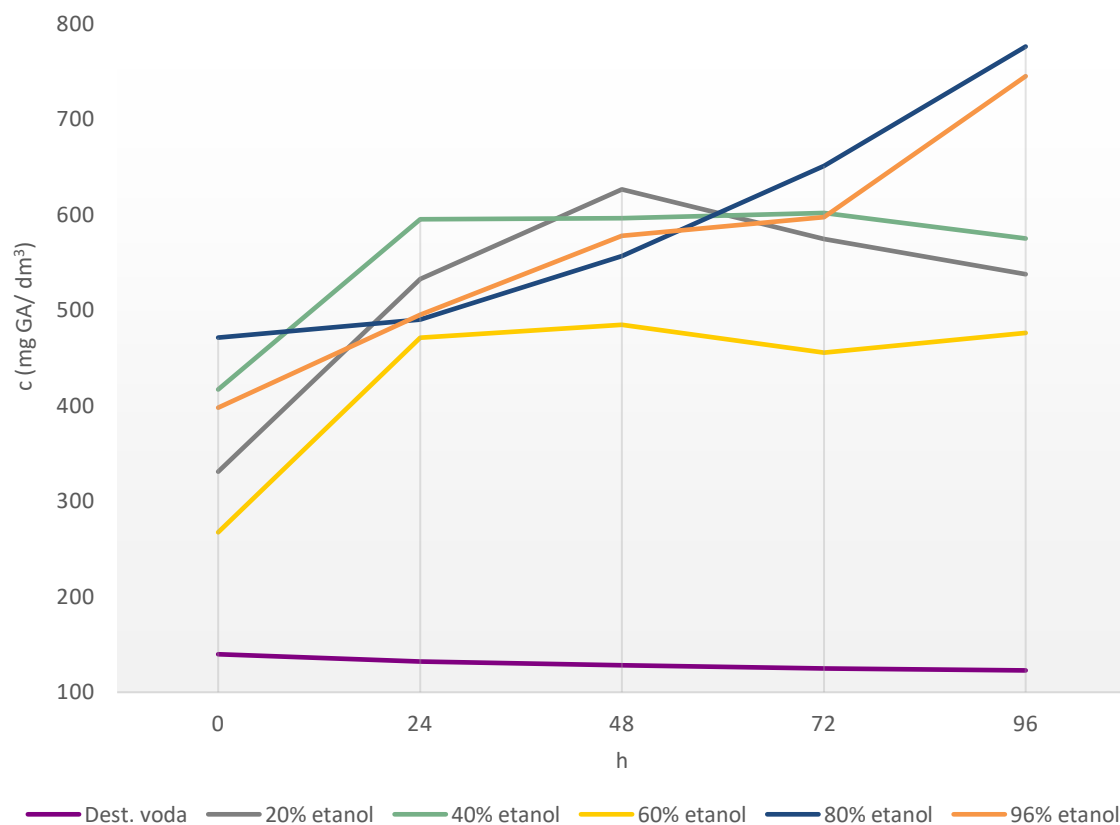
Pri využití vody ako extrakčného činidla (Obr. 15) bol zaznamenaný väčší obsah polyfenolov vo vzorkách sušeného zázvoru. Najväčší obsah stanovovaných látok bol zaznamenaný pre sušený zázvor značky Kotányi, a najnižší pre vzorky odoberané z výluhov čerstvého zázvoru. Celkový obsah polyfenolov sa v závislosti na čase vo všetkých analyzovaných vzorkách zvyšoval.



Obr. 16 Koncentrácie polyfenolov v etanolových výluhoch vzoriek zázvoru

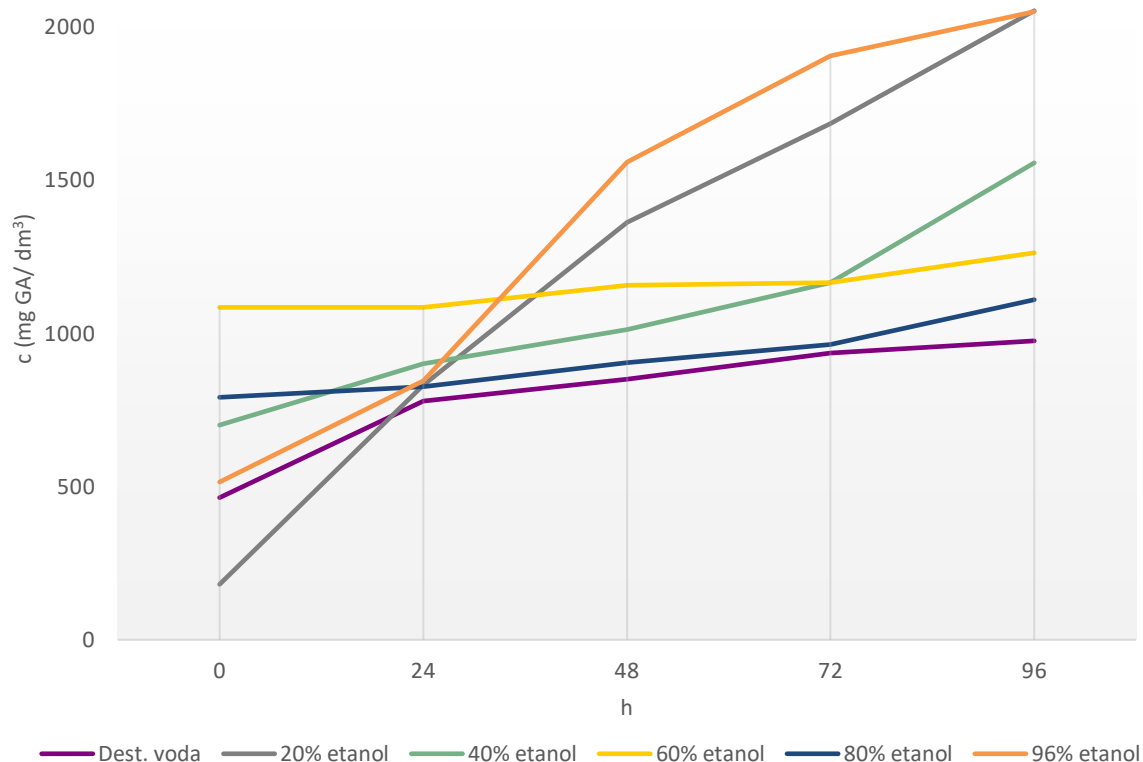
Z obrázku č. 16 vyplýva, že rovnako ako u vodných extraktov najväčší obsah polyfenolov bol zaznamenaný vo vzorkách značky Kotányi. Vzorky čerstvého zázvoru a bio čaju Sonnentor sa lepšie extrahovali do etanolového extrakčného činidla. Naopak pre koreninový prípravok Kotányi sa ako lepšie extrakčné činidlo prejavil 96% etanol. V 96% etanolovom výluhu Kotányi bola zaznamenaná najväčšia koncentrácia polyfenolov (1710,375mg GA/dm³) zo všetkých analyzovaných vzoriek.

Vo všeobecnosti väčší obsah polyfenolov vo vzorkách sušeného zázvoru podrobených dehydratačným procesom podporuje fakty popísané v teoretickej časti. Tepelné procesy a sušenie vedie k chemickým zmenám v obsahu látok – k ich premene a vzniku. Tento trend bol pozorovaný taktiež v práci Yuxin Li 2016, v ktorej bola celková koncentrácia polyfenolov taktiež stanovovaná pomocou Folin-Ciocalteuho činidla. Z výsledkov práce vyplýva, že vzorky sušeného zázvoru taktiež obsahovali väčšie množstvo polyfenolov. Výsledky tejto práce taktiež poukazujú na vplyv typu sušenia na obsah polyfenolov vo vzorkách, čo bude pravdepodobnou príčinou rozdielu v mnou analyzovaných vzorkách sušeného zázvoru. [95]



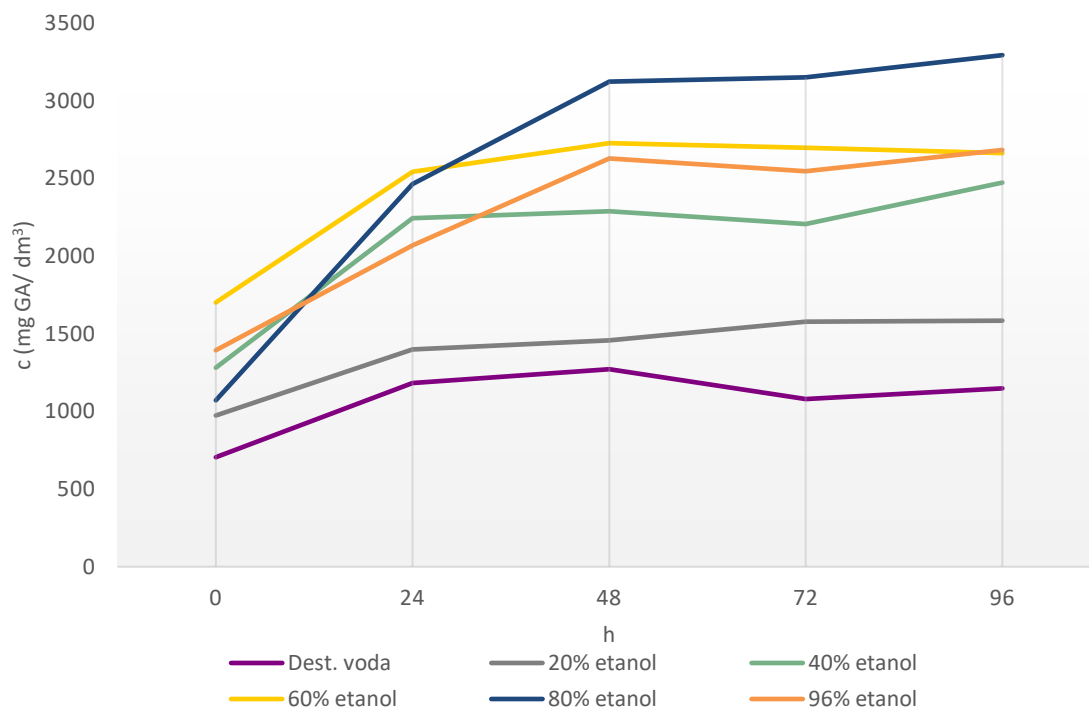
Obr. 17 Extrakčné krivky polyfenolov v macerátoch vzoriek čerstvého zázvoru

Obrázok č. 17 znázorňuje závislosť extrakcie polyfenolov čerstvého zázvoru do šiestich rôznych koncentrácií etanolu v priebehu 96 h. Najnižšiu extrakčnú schopnosť pre vzorku čerstvého zázvoru vykazovala destilovaná voda. Naopak najvhodnejším extrakčným činidlom sa ukázal 80% etanol. Po 72 h sme zaznamenali mierny pokles v obsahu polyfenolov u vzoriek extrahovaných nízko percentnými (do 40 %) extrakčnými etanolovými činidlami.



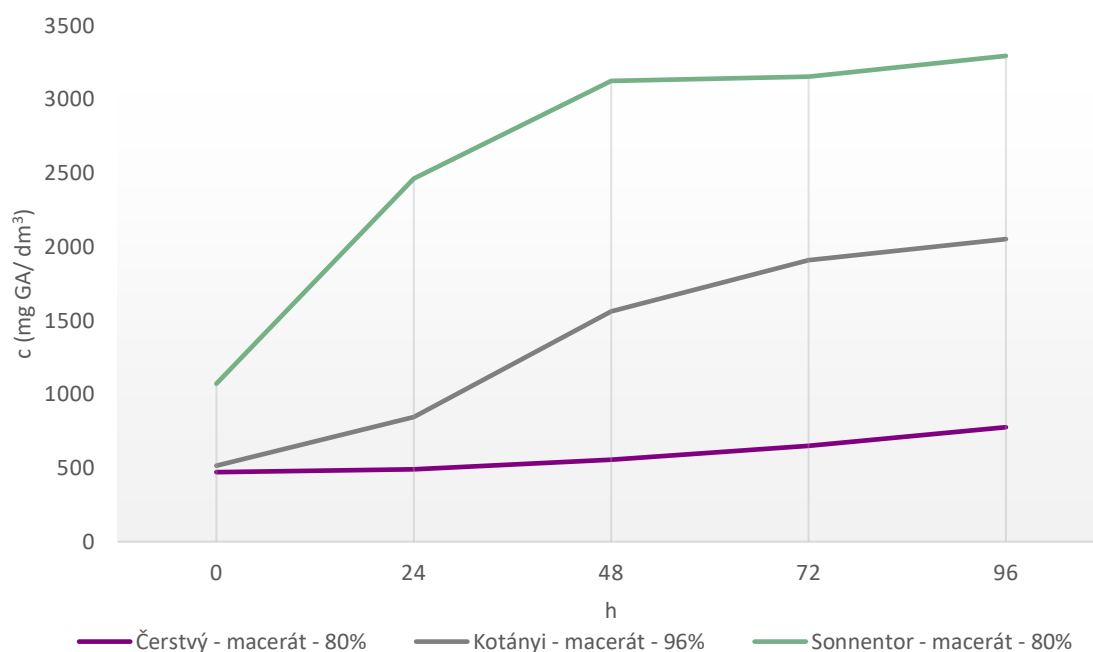
Obr. 18 Extrakčné krivky polyfenolov v macerátoch sušeného zázvoru značky Kotányi

Ako najvhodnejšie extrakčné činidlo pre sušený zázvor od značky Kotányi sa ukázal 96% a 20% roztok etanolu. Rovnako ako aj pre vzorky macerátov čerstvého zázvoru, bola najmenej účinným extrakčným činidlom destilovaná voda. Na rozdiel od vzoriek čerstvého zázvoru všetky vzorky macerátov extrahované vo všetkých extrakčných činidlách vykazovali aj po 72 h stúpajúci trend obsahu celkových polyfenolov.



Obr. 19 Extrakčné krivky polyfenolov v macerátoch sušeného zázvoru značky Sonnentor

Podobne ako pri macerácii čerstvého zázvoru najväčší obsah polyfenolov po macerácii vzorky sušeného zázvoru značky Sonnentor vykazovala vzorka s 80% etanolom. Opätovne sa destilovaná voda ukázala ako najmenej vhodné extrakčné činidlo u všetkých troch analyzovaných vzoriek čerstvého a sušeného zázvoru.



Obr. 20 Extrakčné krivky polyfenolov v macerátoch jednotlivých vzoriek zázvoru s najväčším obsahom polyfenolov

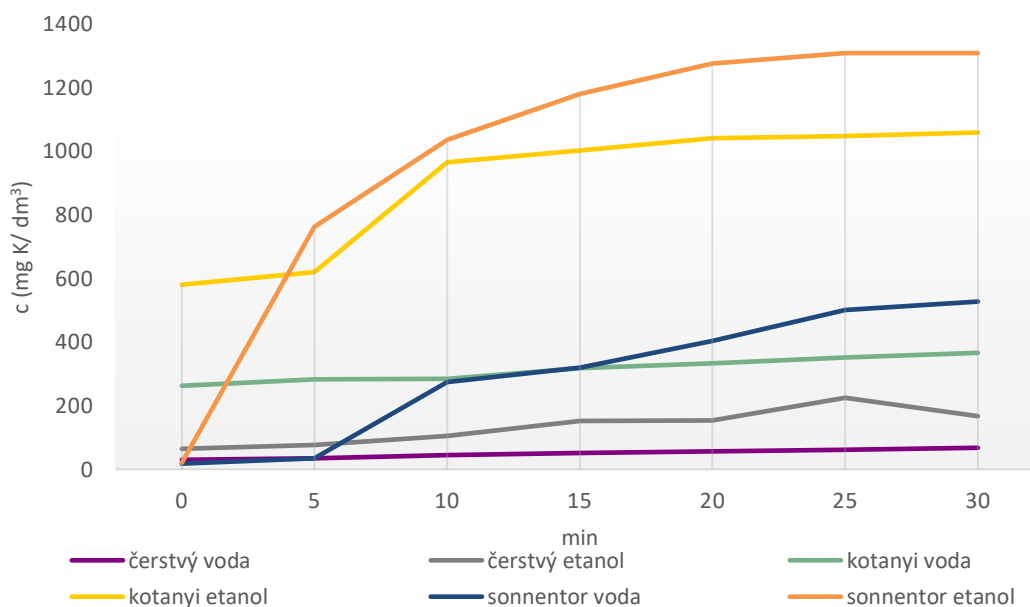
Obrázok č. 20 a tabuľka č. 1 porovnáva obsah celkových polyfenolov troch analyzovaných zázvorových vzoriek a ich najkoncentrovanejších macerátov. Najväčší obsah polyfenolov sa nachádzal v 80% etanolevom maceráte vzorky značky Sonnentor. Naopak najnižší obsah sme zaznamenali vo vzorke čerstvého zázvoru macerovaného v 80% etanole. Všetky tri krivky vykazovali aj po 96 h tendenciu mierneho rastu.

Tab. 1 Prehľad niektorých koncentrácií polyfenolov

	koncentrácia	0 h	24 h	48 h	64 h	96 h
Čerstvý 80 %	[mg GA/dm ³]	471,23	490,27	556,56	651,07	775,89
Kotányi 96 %	[mg GA/dm ³]	515,06	844,75	1560,38	1907,25	2051,00
Sonnenator 80 %	[mg GA/dm ³]	1070,90	2462,50	3121,68	3150,98	3292,58

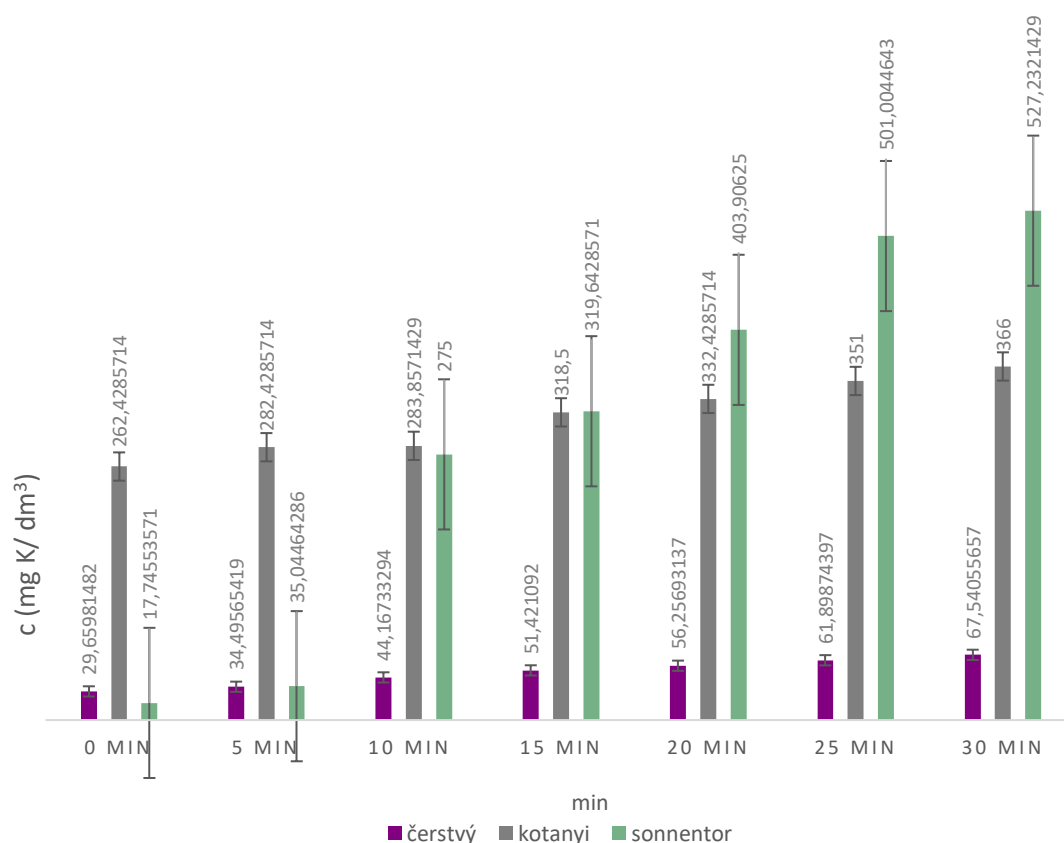
4.2 Stanovenie celkových flavonoidov

Na stanovenie celkového obsahu flavonoidov bola využitá metóda reakcie hlinitej soli s dusitanom, kde v prítomnosti flavonoidov vzniká farebný komplex. Meraná bola absorbancia pri vlnovej dĺžke 510 nm. Meranie sa pre každú vzorku opakovalo trikrát, z čoho bola následne vypočítaná priemerná hodnota. Celkový obsah flavonoidov bol vypočítaný využitím kalibračnej regresnej rovnice katechínu.



Obr. 21 Extrakčné krivky flavonoidov vo vodných a etanolevých výluhoch jednotlivých vzoriek zázvoru

Obrázok č. 21 zachytáva závislosť obsahu flavonoidov v jednotlivých vzorkách etanolových a vodných výluhov na čas. Z grafu vyplýva, že najväčší obsah flavonoidov vo vzorkách výluhov bol zaznamenaný v etanolovom výluhu čerstvého BIO čaju značky Sonnentor. Naopak najnižší obsah flavonoidov bol prítomný vo vodnom výluhu čerstvého zázvoru. Pre všetky analyzované vzorky sa ukázalo ako vhodnejšie extrakčné činidlo 96% etanol.

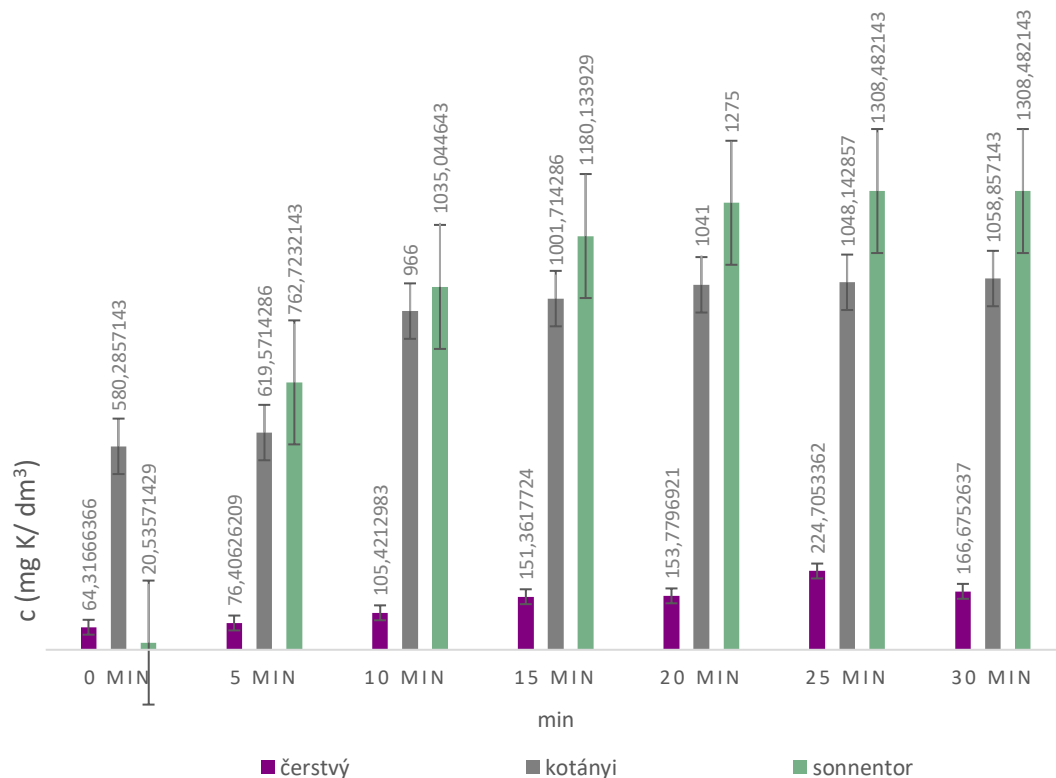


Obr. 22 Koncentrácie flavonoidov vo vodných výluhoch vzoriek zázvoru

Ako z Obr. 21 vyplýva, destilovaná voda je pre všetky analyzované vzorky menej účinným extrakčným činidlom. Obr. 23 zaznamenáva priebeh extrakcie flavonoidov do etanolového extrakčného činidla v rozmedzí 30 min. Pri všetkých vzorkách obsah flavonoidov stúpal so zvyšujúcim sa časom extrakcie. Maximum extrahovaných flavonoidov bolo pre všetky vzorky zázvoru v 30 min.

Vo všeobecnosti väčší obsah flavonoidov bol zaznamenaný vo vzorkách sušeného zázvoru s najväčším obsahom flavonoidov vo vzorke BIO čaju Sonnentor. Z nameraných výsledkov môžeme konštatovať, že ku extrakcii flavonoidov do etanolu pri vzorke Bio čaju Sonnentor dochádza postupne. Rozdiel v čase 0 min a 30 min je až približne 510 mg K/dm³. Pri vzorke sušeného koreninového prípravku Kotányi môžeme konštatovať, že k výraznej extrakcii došlo už v nulte minúte po zaliatí a v následných 30 minútach nedošlo ku výraznému prírastku ako pri vzorke Sonnentor. Rozdiel medzi 0 min a 30 min extrakcie bol približne 105 mg K/dm³. Pre

vzorku čerstvého zázvoru môžeme pozorovať približne konštantný prírastok flavonoidov pri analýze vzoriek odoberaných v intervaloch piatich minút.

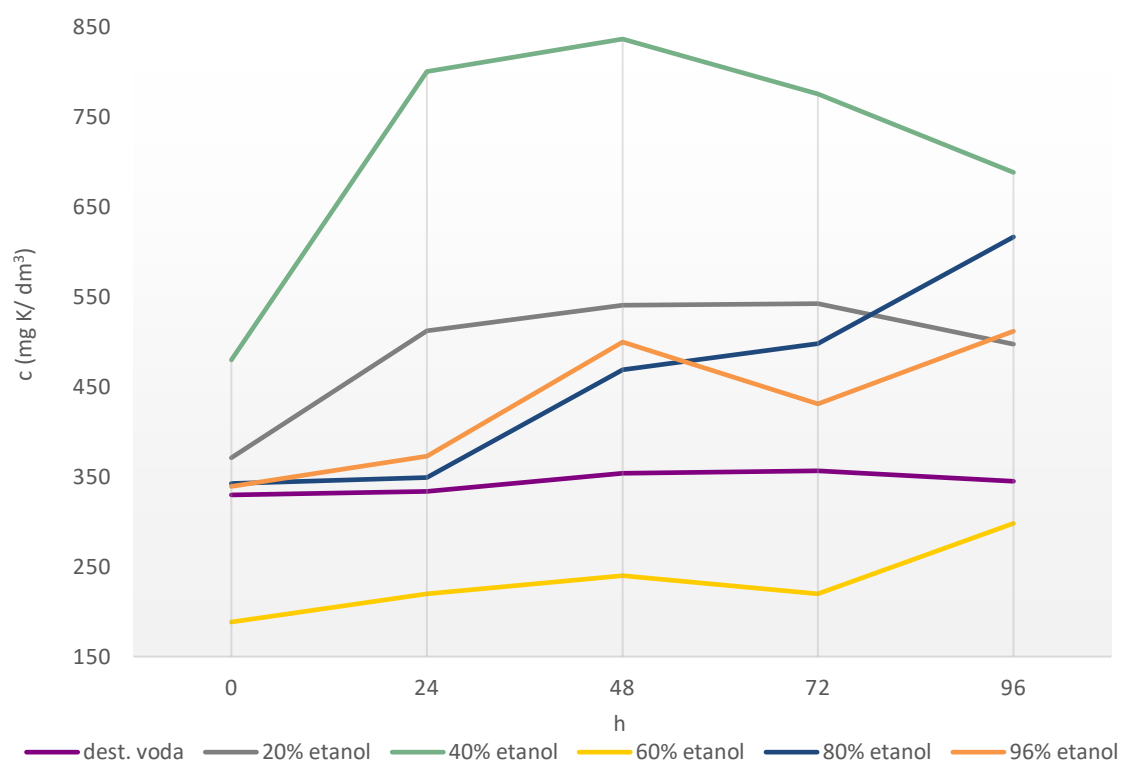


Obr. 23 Koncentrácie flavonoidov v etanolvých výluhoch vzoriek zázvoru

Obrázok č. 23 zaznamenáva prírastok obsahu flavonoidov vo vzorkách zázvoru lúhovaných v etanole počas tridsiatich minút. Opäť môžeme pozorovať trend stúpajúceho obsahu flavonoidov s rastúcim časom extrakcie, s maximálnym obsahom pri vzorkách odoberatých v čase 30 min. Rovnako aj pri vodných výluhoch, najväčší obsah flavonoidov bol zaznamenaný pre vzorku BIO zázvorového čaju Sonnentor. Môžeme konštatovať, že ku extrakcii flavonoidov zo vzorky Sonnentor opätovne nedošlo bezprostredne po zaliatí extrakčným činidlom, avšak až v čase 5 min. Najnižší obsah flavonoidov bol zaznamenaný vo vzorke čerstvého zázvoru.

Tab. 2 Obsahu flavonoidov v čase 30 min pre analyzované vzorky zázvoru v oboch extrakčných činidlách.

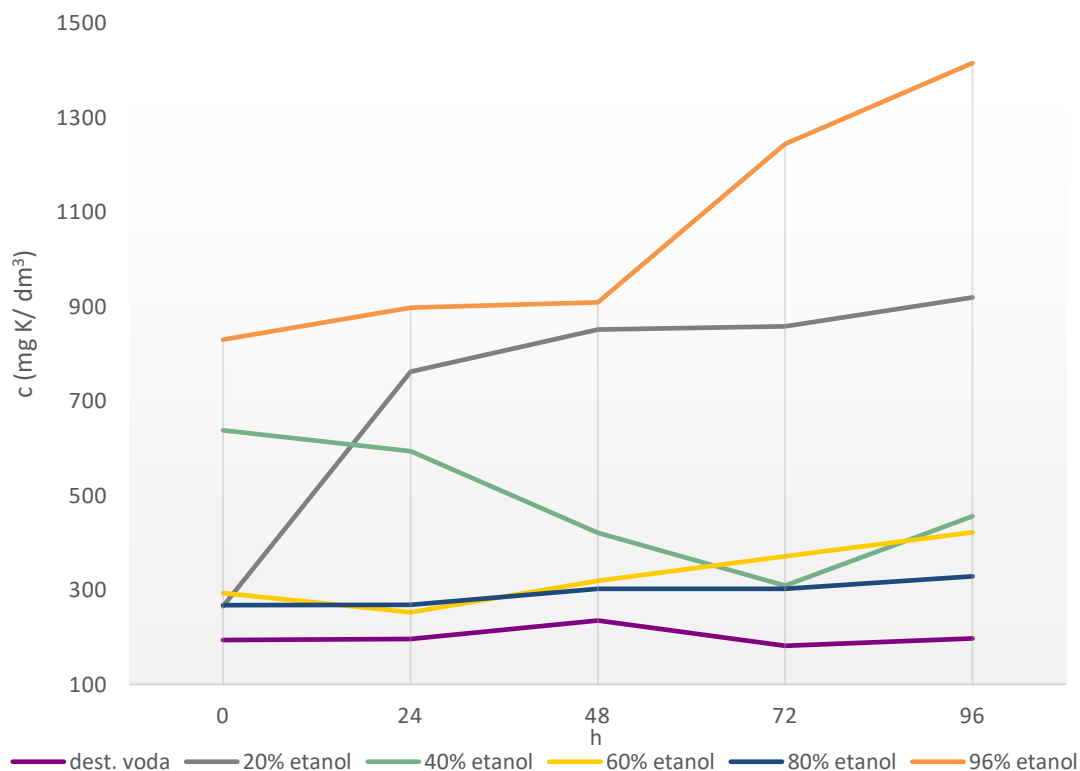
	koncentrácia	čerstvý	Kotányi	Sonnentor
Destilovaná voda	[mg K/ dm ³]	29,92857	366	527,2321
96% etanol	[mg K/ dm ³]	73,85714	1058,857	1308,482



Obr. 24 Extrakčné krivky flavonoidov v macerátoch vzoriek čerstvého zázvoru

Na obrázku č. 24 môžeme vidieť závislosť extrakcie flavonoidov z čerstvého zázvoru na čase pri macerácii v šiestich extrakčných činidlách počas 96 h. Ako najvhodnejšie extrakčné činidlo sa ukázal etanol v koncentrácii 40 %. Najnižšia extrakcia flavonoidov bola zaznamenaná pre 60% etanol.

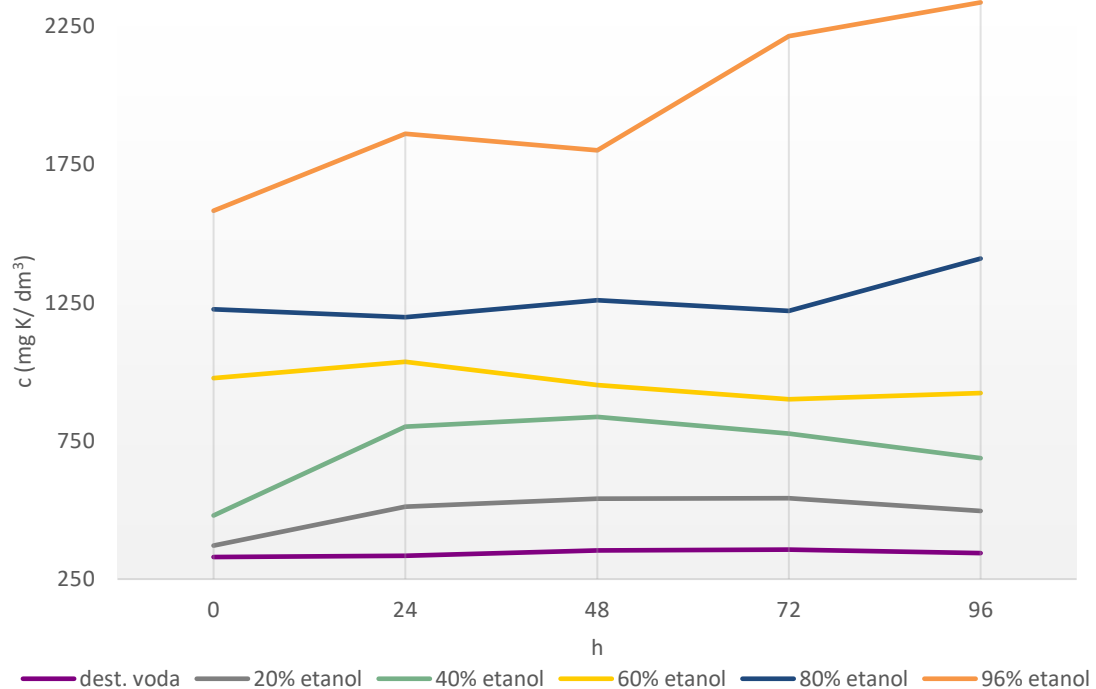
Pre extrakčné činidlá s nižšou koncentráciou etanolu (do 40 %) nastal rovnaký trend ako pri stanovení polyfenolov a to pokles ich koncentrácie v čase medzi 48 h a 72 h. Pri extrakcii polyfenolov sa ako vhodnejšie extrakčné činidlá ukázali vysoko percentné etanolové činidlá (80 %, 96 %), kde naopak pri stanovení flavonoidov sa uplatnili etanolové extrakčné činidlá o koncentrácii 40 % a 20 %.



Obr. 25 Extrakčné krivky flavonoidov v macerátoch sušeného zázvoru značky Kotányi

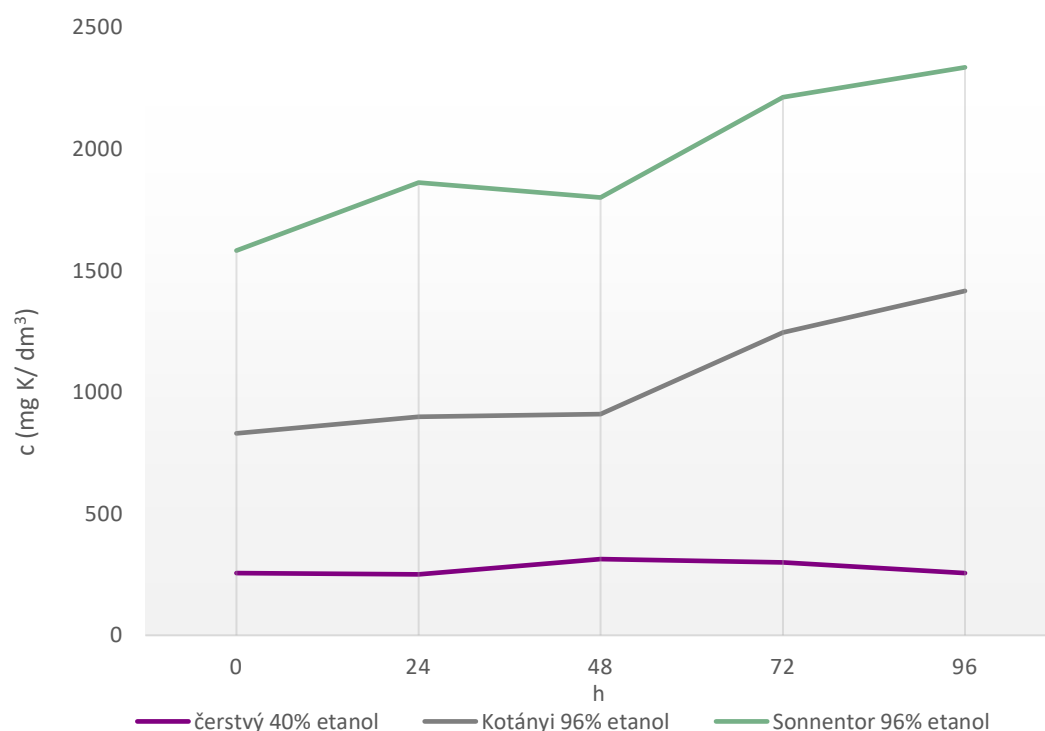
Na rozdiel od čerstvého zázvoru, kde najväčší obsah flavonoidov bol zaznamenaný pri extrakcii pomocou 40 % etanolu, sa ako najvhodnejšie extrakčné činidlo pre vzorku sušeného koreninového prípravku značky Kotányi ukázal etanol v koncentrácii 96 %. (Obr. 25) Najmenej účinné extrakčné činidlo bola destilovaná voda.

Pri stanovení celkových polyfenolov v macerátoch sušeného zázvoru Kotányi boli taktiež najväčšie výťažky zaznamenané pre 96% a 20% macerát. Z tohto zistenia vyplýva, že na extrakciu bioaktívnych látok zo sušeného mletého koreninového prípravku značky Kotányi sú vhodné práve extrakčné činidlá o týchto koncentráciách.



Obr. 26 Extrakčné krivky flavonoidov v macerátoch sušeného zázvoru značky Sonnentor

Rovnako ako aj pre maceráciu sušeného zázvoru Kotányi, sa ako najvhodnejšie extrakčné činidlo pre extrakciu flavonoidov z bio čaju Sonnentor ukázal 96% etanol. Najnižšiu koncentráciu flavonoidov sme zaznamenali v destilovanej vode. Rovnaký trend bol zaznamenaný aj pre extrakciu polyfenolov, kde ako najvhodnejšie extrakčné činidlá slúžili 80% a 96% etanol. Zo získaných výsledkov zobrazených na obrázku č. 26 môžeme pozorovať, že zo zvyšujúcou sa koncentráciou etanolu ako extrakčného činidla, sa zvyšuje aj obsah flavonoidov v macerátoch.



Obr. 27 Extrakčné krivky flavonoidov v macerátoch jednotlivých vzoriek zázvoru s najväčším obsahom flavonoidov

Na obrázku č. 27 a v tabuľke č. 3 môžeme vidieť porovnanie macerátov s najvyšším obsahom flavonoidov pre jednotlivé vzorky zázvoru. Vzorky sušeného zázvoru vykazovali tendenciu pribúdania flavonoidov vo vzorkách aj po 96 hodinovej macerácii. Pre obe vzorky sušeného zázvoru bol najvhodnejším extrakčným činidlom 96% etanol. Pre vzorku čerstvého zázvoru to bol 40% etanol. Z uvedených výsledkov vidíme, že najväčší obsah flavonoidov bol vo vzorke 96% macerátu BIO čaju Sonnentor. Ten obsahoval aj druhú najväčšiu koncentráciu polyfenolov zo všetkých analyzovaných vzoriek. Z tohto zistenia vyplýva, že najväčšia koncentrácia analyzovaných bioaktívnych látok bola zaznamenaná práve vo vzorkách 80% a 96% macerátu značky Sonnentor.

Tab. 3 Koncentrácia flavonoidov v zázvorových macerátoch

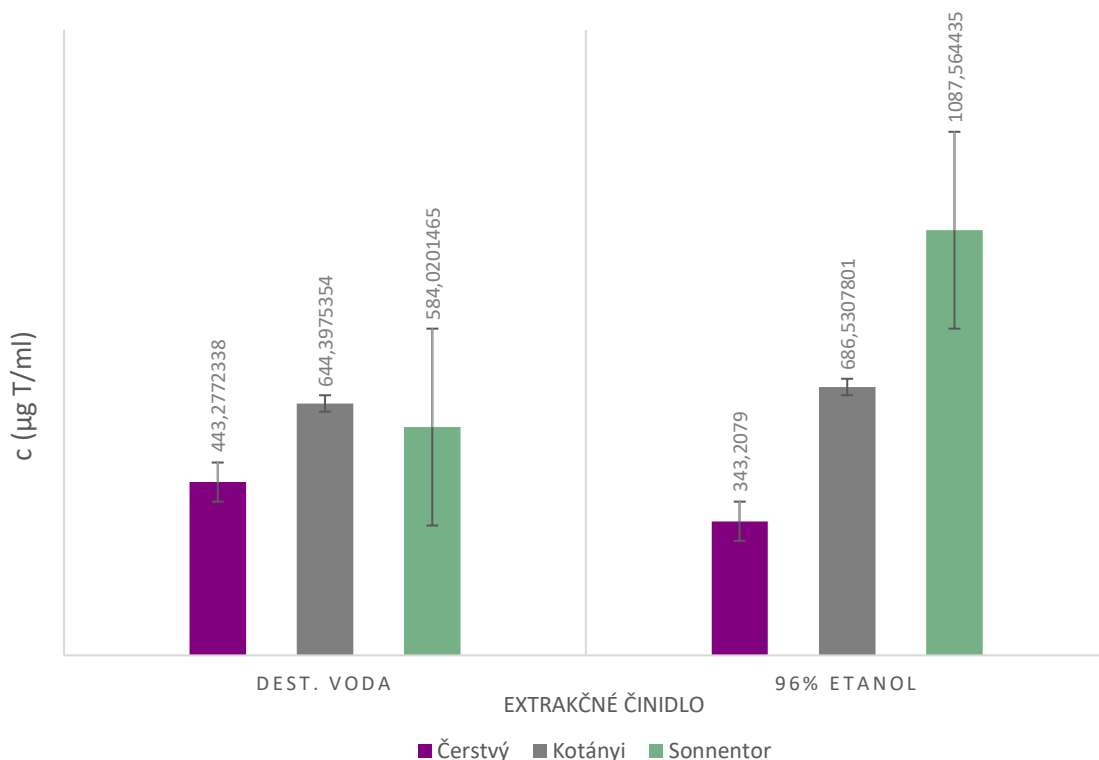
koncentrácia		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Čerstvý 40 %	[mg K/ dm ³]	256,1383	250,4965	313,3624	299,6608	255,3323
Kotányi 96 %	[mg K/ dm ³]	830,2857	898,1429	908,8571	1244,571	1416
Sonnentor 96 %	[mg K/ dm ³]	1581,92	1860,938	1799,554	2212,5	2335,268

4.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Na stanovenie antioxidačnej aktivity zázvorových vzoriek bola využitá metóda ABTS, ktorej princípom je zhášanie radikál-katiónu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ v prítomnosti vzorky s antioxidačnou aktivitou. Katión-radikál $\text{ABTS}^{\cdot+}$ bol pripravený reakciou ABTS s peroxidisíranom draselným. Vyhodnotenie antioxidačných vlastností vzoriek prebiehalo spektrofotometricky, stanovením poklesu absorbancie na základe zmien absorpčného spektra ABTS. Následne bola výsledná absorbanca vypočítaná pomocou vzorca:

$$A = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0}$$

, kde A_0 predstavuje hodnotu absorbancie $\text{ABTS}^{\cdot+}$ v čase $t=0$ min a A_{10} predstavuje hodnotu absorbancie v 10 minúte po pridaní vzorky ku $\text{ABTS}^{\cdot+}$.



Obr. 28 Grafické porovnanie antioxidačnej aktivity jednotlivých zázvorových výluhov v 30 min v destilovanej vode a 96% etanole

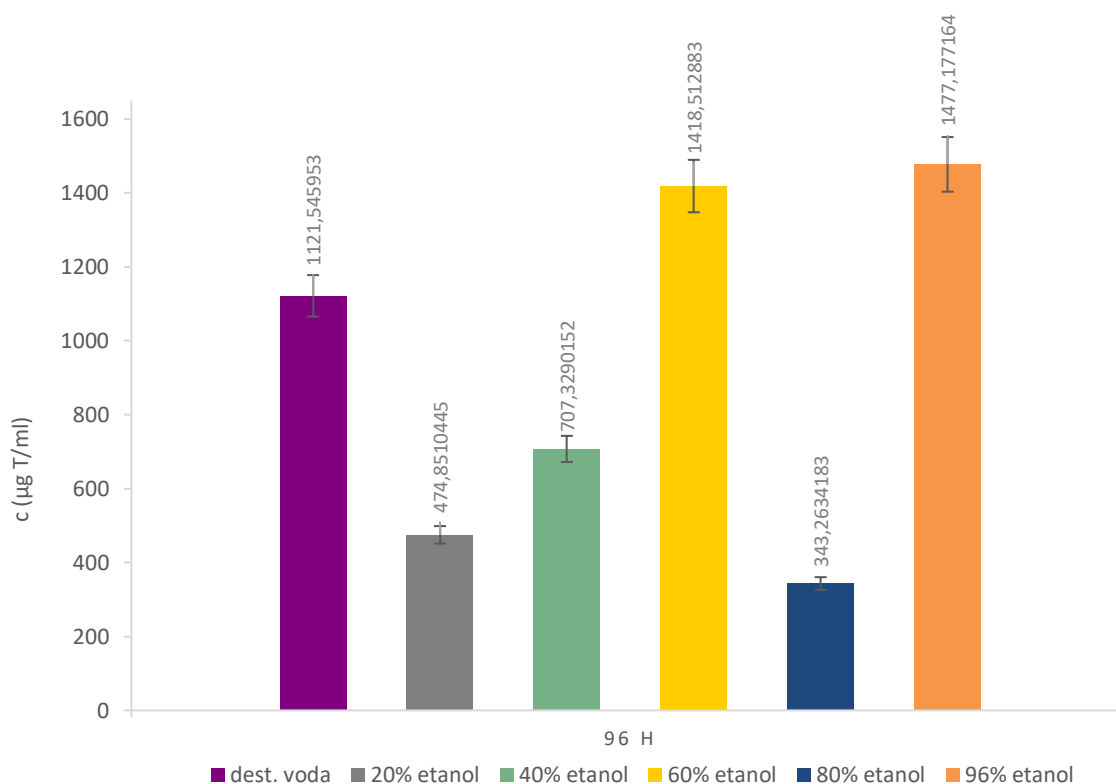
Na obrázku č. 28 môžeme vidieť grafické porovnanie antioxidačných vlastností jednotlivých vzoriek zázvoru v rôznych typoch rozpúšťadla v 30 minúte. Pri vodnom výluhu čerstvého zázvoru bola preukázaná vyššia antioxidačná aktivita, čo podporuje aj poznatky uvedené v teoretickej časti. Antioxidačné vlastnosti zázvoru sú pripisované veľkému obsahu polyfenolov – gingerolov a shogoalov. Z čoho vyplýva, že meranie súhlasí aj s výsledkami získanými meraním celkového obsahu polyfenolov, kde bola taktiež zaznamenaná vyššia

koncentrácia vo vzorkách čerstvého zázvoru, kde bolo využité ako extrakčné činidlo destilovaná voda.

Naopak získané výsledky antioxidačných vlastností BIO čaju značky Sonnentor, vykazujú opačný trend. Aj napriek vyššiemu obsahu polyfenolov vo vzorkách s destilovanou vodou ako extrakčným činidlom, vyššiu antioxidačnú aktivitu vykazujú vzorky extrahované 96% etanolom.

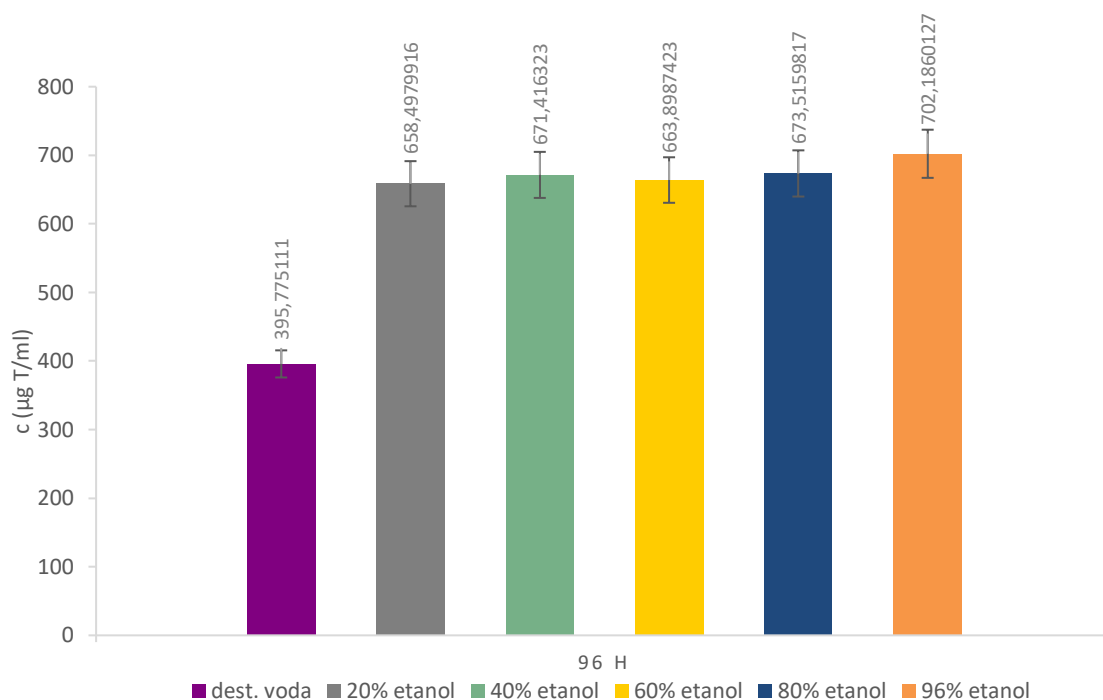
Pri porovnaní výsledkov pre etanolové a vodné výluhy koreninového prípravku Kotányi sme nezaznamenali výrazný rozdiel. Toto zistenie podporuje aj výsledky získané pre meranie celkového obsahu polyfenolov, kde bola ich koncentrácia v 30 minúte približne rovnaká.

Pri porovnaní výsledkov získaných meraním celkovej hodnoty polyfenolov a antioxidačných vlastností jednotlivých vzoriek 30 min výluhov môžeme vidieť, že aj napriek tomu, že sušený zázvor značky Kotányi vykazuje väčšiu koncentráciu polyfenolov ako ostatné vzorky, jeho antioxidačná aktivita je nižšia ako u Bio čaju Sonnentor.



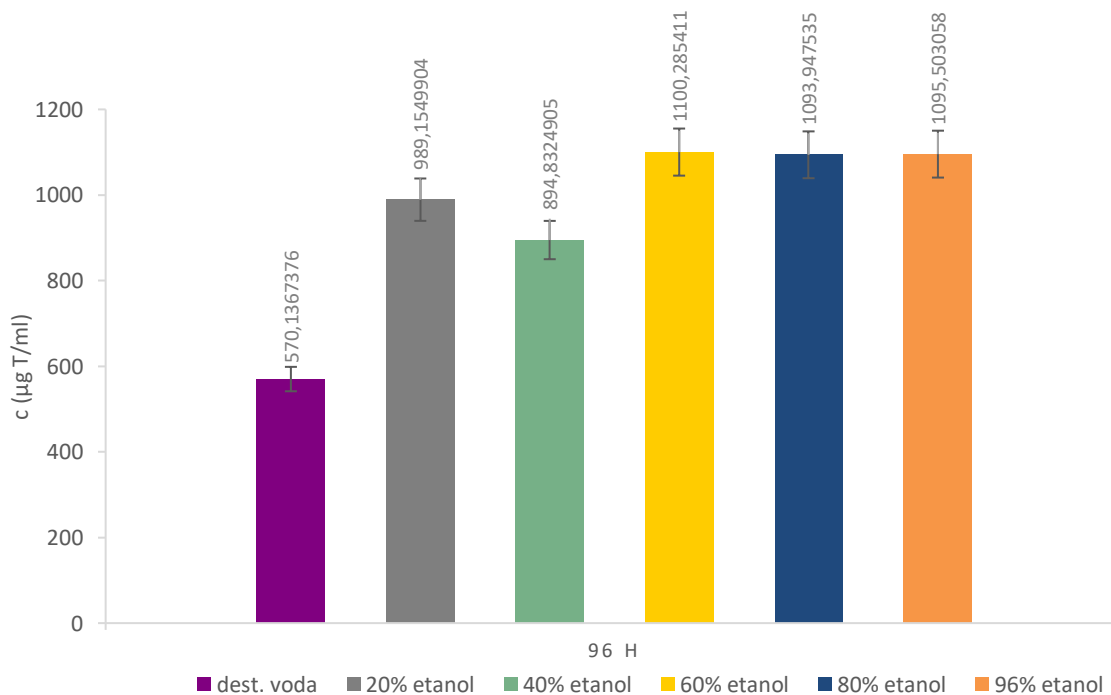
Obr. 29 Grafické porovnanie antioxidačnej aktivity jednotlivých macerátov čerstvého zázvoru v 96 h v rôznych extrakčných činidlách

Z obrázku č. 29 vyplýva, že najvhodnejšími extrakčnými činidlami, pre dosiahnutie najvyššej antioxidačnej aktivity, bola destilovaná voda, 60% etanol a 96% etanol. Naopak najmenej vhodným extrakčným činidlom bol 80% etanol, aj napriek tomu že tento macerát obsahoval veľké množstvo polyfenolov.



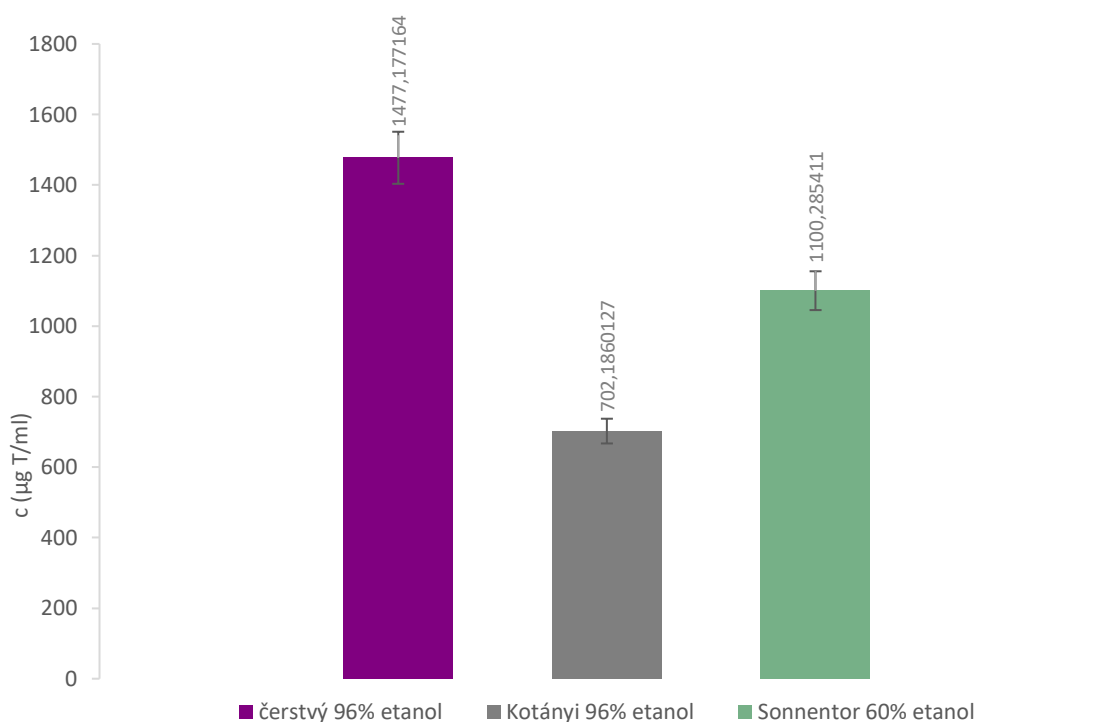
Obr. 30 Grafické porovnanie antioxidačnej aktivity jednotlivých macerátov koreninového prípravku značky Kotányi v 96 h v rôznych extrakčných činidlách

Z uvedeného grafu (Obr. 30) môžeme konštatovať, že ako vhodné extrakčné činidlá pre získanie najväčšej antioxidačnej aktivity macerátov sušeného zázvoru značky Kotányi boli všetky extrakčné činidlá obsahujúce etanol. Všetky etanolové maceráty v rozmedzí koncentrácií 20–96% etanolu dosahovali približne rovnaké hodnoty antioxidačnej aktivity.



Obr. 31 Grafické porovnanie antioxidačnej aktivity jednotlivých macerátov bio čaju značky Sonnentor 96 h v rôznych extrakčných činidlách

Na obrázku č. 31 môžeme pozorovať rovnaký trend antioxidačnej aktivity bio čaju Sonnentor ako v prípade sušeného zázvoru značky Kotányi (Obr. 30). Extrakčné činidlá s obsahom etanolu vykazovali vyššiu antioxidačnú aktivitu, ako macerát destilovanej vody. Najväčšiu antioxidačnú aktivitu dosahovali maceráty s 60 %, 80 %, 96 % etanolom. Zo získaných výsledkov môžeme konštatovať, že vo všeobecnosti pre získanie najväčšej antioxidačnej aktivity sušeného zázvoru sú najvhodnejšie etanolové extrakčné činidlá. Pri porovnaní výsledkov zo vzorkami čerstvého zázvoru môžeme vidieť, že čerstvý zázvor dosiahol porovnateľnú antioxidačnú aktivitu aj v destilovanej vode. Výsledná hodnota v 96 h pre čerstvý zázvor macerovaný v destilovanej vode (1121,14 $\mu\text{gT/ml}$), je dokonca vyššia ako u sušených zázvorov s vyšším obsahom polyfenolov a flavonoidov. Tento trend môže byť spôsobený postupom pri spracovaní čerstvého zázvoru pri výrobe sušených prípravkov, napríklad tepelným režimom pri spracovaní alebo skladovaní, čo môže ovplyvniť chemické zastúpenie bioaktívnych látok a ich vlastnosti.



Obr. 32 Grafické porovnanie macerátov s najväčšou antioxidačnou aktivitou

Z obrázka č. 32 môžeme vidieť, že všetky testované vzorky zázvoru dosahovali najvyššiu antioxidačnú aktivitu pri využití etanolového extrakčného činidla. Pre čerstvý zázvor a bio čaj Sonnentor to bol 96% etanol a pre sušený zázvor Kotányi 60% etanol. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu dosiahol 96 h macerát čerstvého zázvoru, aj napriek tomu, že obsahoval najnižšiu koncentráciu polyfenolov.

4.4 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Na overenie antimikrobiálnej aktivity vzoriek zázvoru bola použitá difúzna jamková metóda. Testovaná boli tri grampozitívne baktérie *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus*. Testovanou gramnegatívnou baktériou bola *Serratia marcescens*. Všetky testované mikroorganizmy boli kultivované na univerzálnom agare po dobu 24 hodín pri teplote 27 °C.

Testované boli antimikrobiálne vlastnosti 30 minútové výluhy všetkých troch vzoriek zázvoru v oboch extrakčných činidlách a odber z macerátov v 96 h. Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity čerstvého zázvoru a bio čaju Sonnentor bol vybraný 60% etanolvý macerát a pre koreninový prípravok značky Kotányi 80% etanolvý macerát. Aj napriek tomu, že 96% etanolvý macerát čerstvého zázvoru a sušeného zázvoru značky Kotányi dosahoval vyššiu antioxidačnú aktivitu, zvolené koncentrácie dosahovali približne rovnaké hodnoty a z praktického hľadiska majú častejšie využitie ako napríklad pri výrobe tinktúr.

Získané výsledky vzniku a veľkosti inhibičných zón testovaných vzoriek sú zhrnuté v tabuľke č. 4.

Tab. 4 Prehľad vzniku inhibičných zón

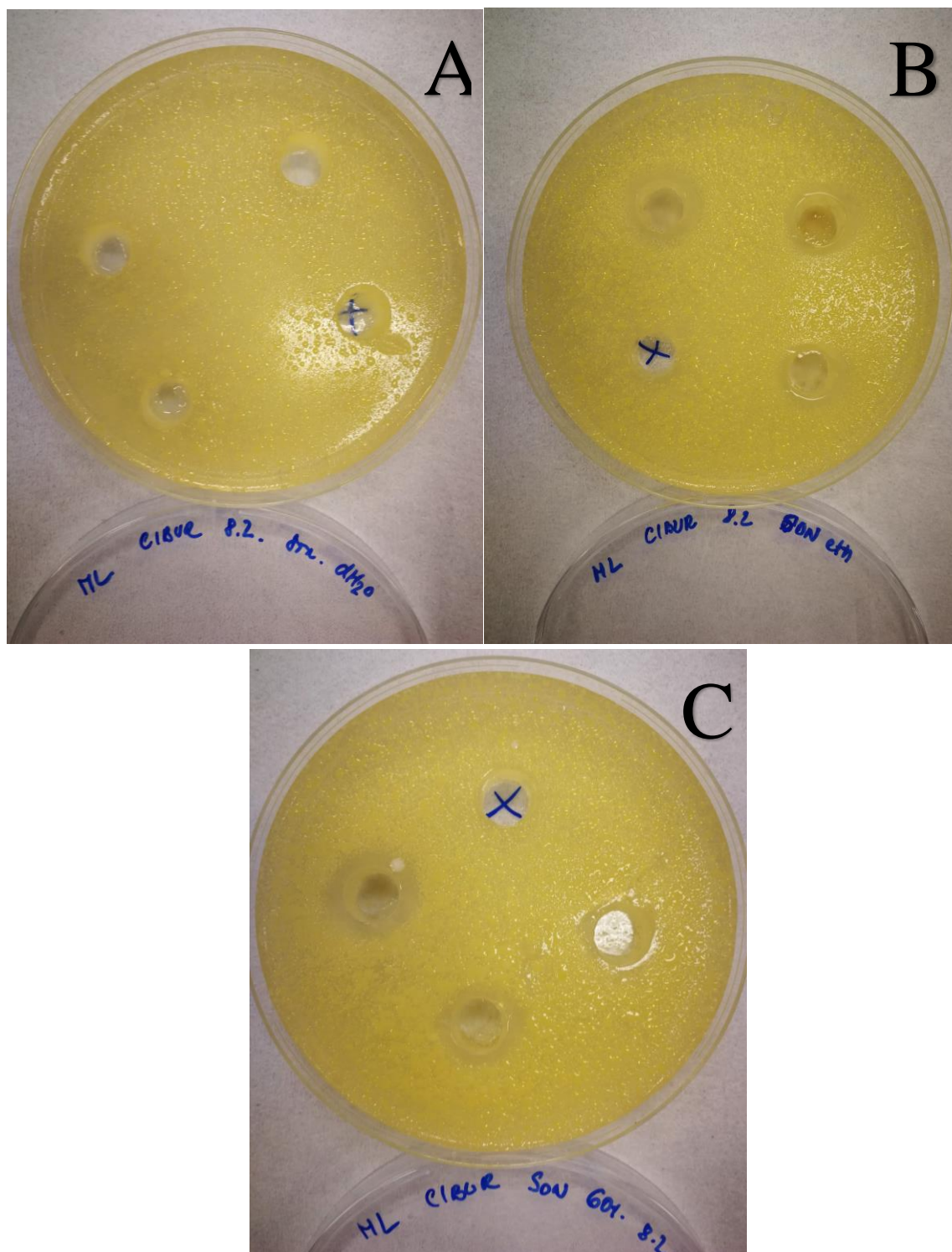
	Čerstvý zázvor			Sušený zázvor – Kotányi			Bio 100% zázvorový čaj – Sonnentor		
	Výluh		Macerát	Výluh		Macerát	Výluh		Macerát
	dH ₂ O	96 %	60 %	dH ₂ O	96 %	80 %	dH ₂ O	96 %	60 %
ML	x	x	x	x	x	x	x	0,4 ± 0,08	0,33 ± 0,09
BS	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BC	x	x	x	x	x	x	x	x	x
SM	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Z tabuľky č. 4 vyplýva, že z testovaných vzoriek zázvorových macerátov a výluhov vykazovali antimikrobiálny účinok jedine etanolvý 30 minútový výluh BIO čaju značky Sonnentor a jeho 60% macerát odobratý v 96 h. Účinné boli voči grampozitívnemu kmeňu *Micrococcus luteus*. Testované vzorky nemali voči ostatným mikrobiálnym druhom antimikrobiálny účinok.

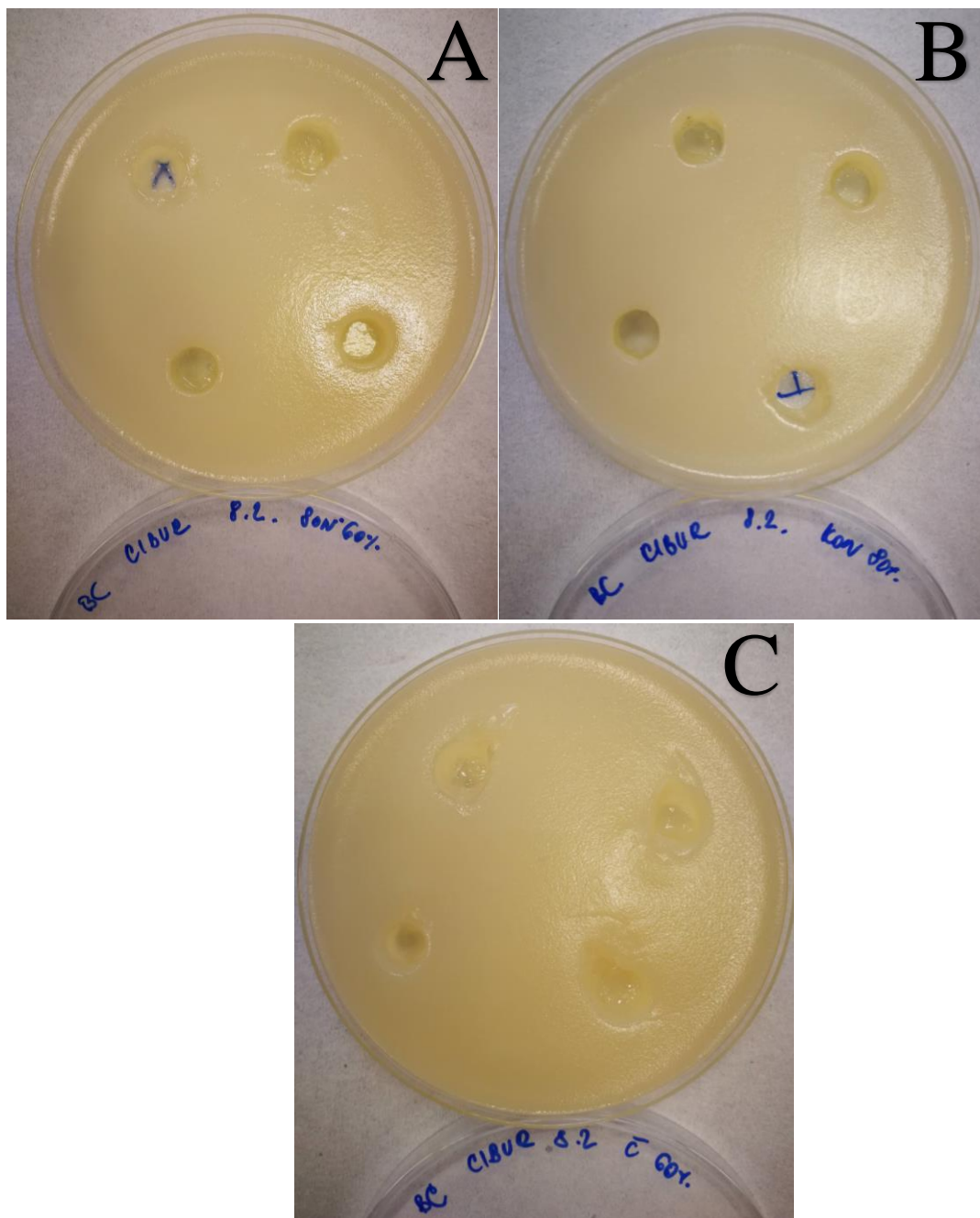
V dostupnej literatúre sú však opísané mnohé výrazne antimikrobiálne vlastnosti zázvorových extraktov. Podľa práce Karupiah 2012 zázvor už v malých koncentráciách vykazuje silné antibakterálne účinky voči *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, či *E. coli*. [64].

Antimikrobiálne vlastno zázvoru sú pripisované veľkému obsahu polyfenolov. Aj napriek ich vysokej koncentrácii v testovaných vzorkách, sa u väčšiny antimikrobiálna aktivita vôbec neprejavila. Testovanie antimikrobiálnych vlastností zázvorových extraktov som opakovala 2x, kde pri prvom testovaní ani jedna vzorka nevykazovala antimikrobiálnu aktivitu.

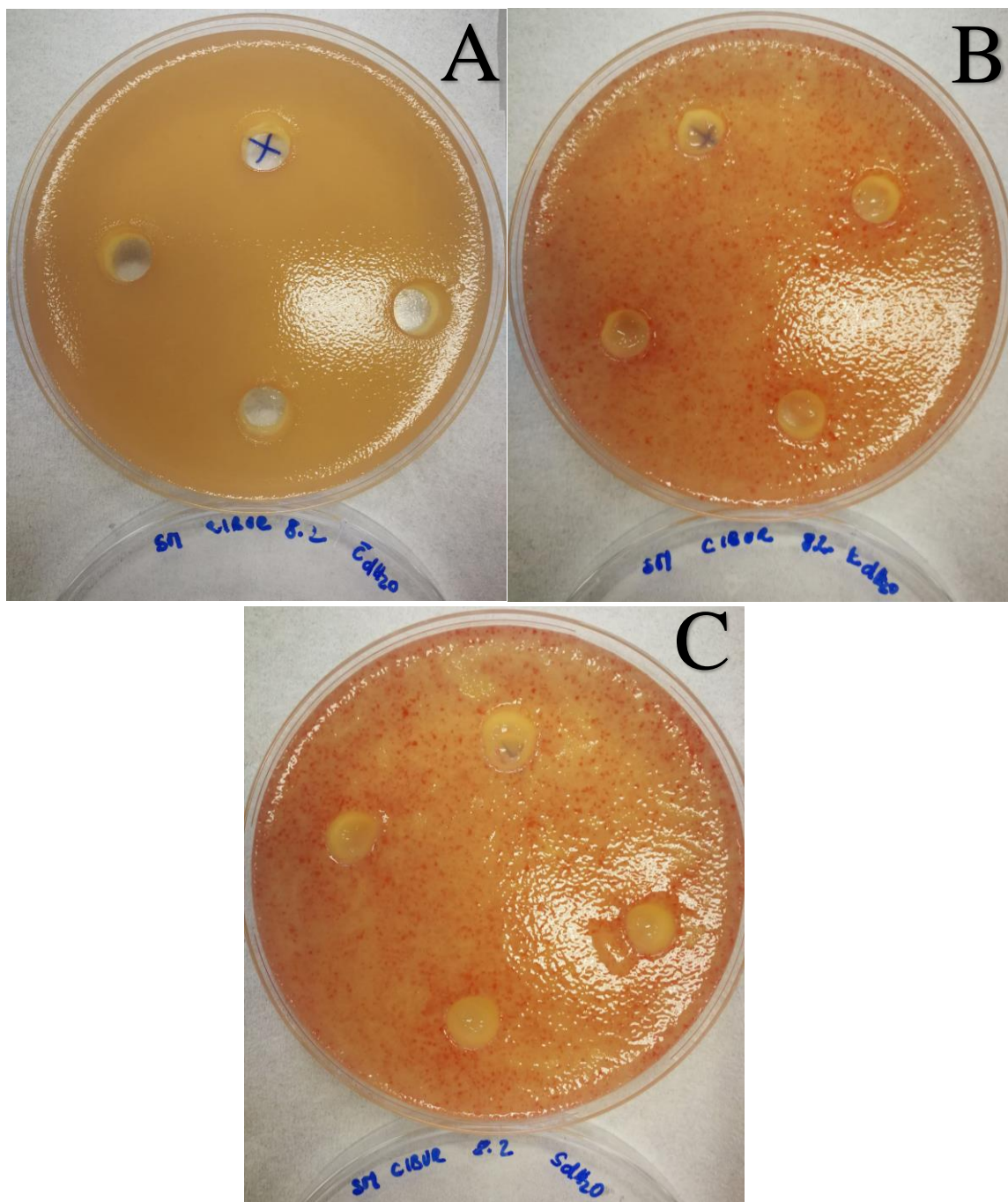
Slabé antimikrobiálne vlastnosti testovaných zázvorových vzoriek mohli byť spôsobené postupmi pri príprave zázvorových vzoriek, či použitou mikrobiálnou kultúrou.



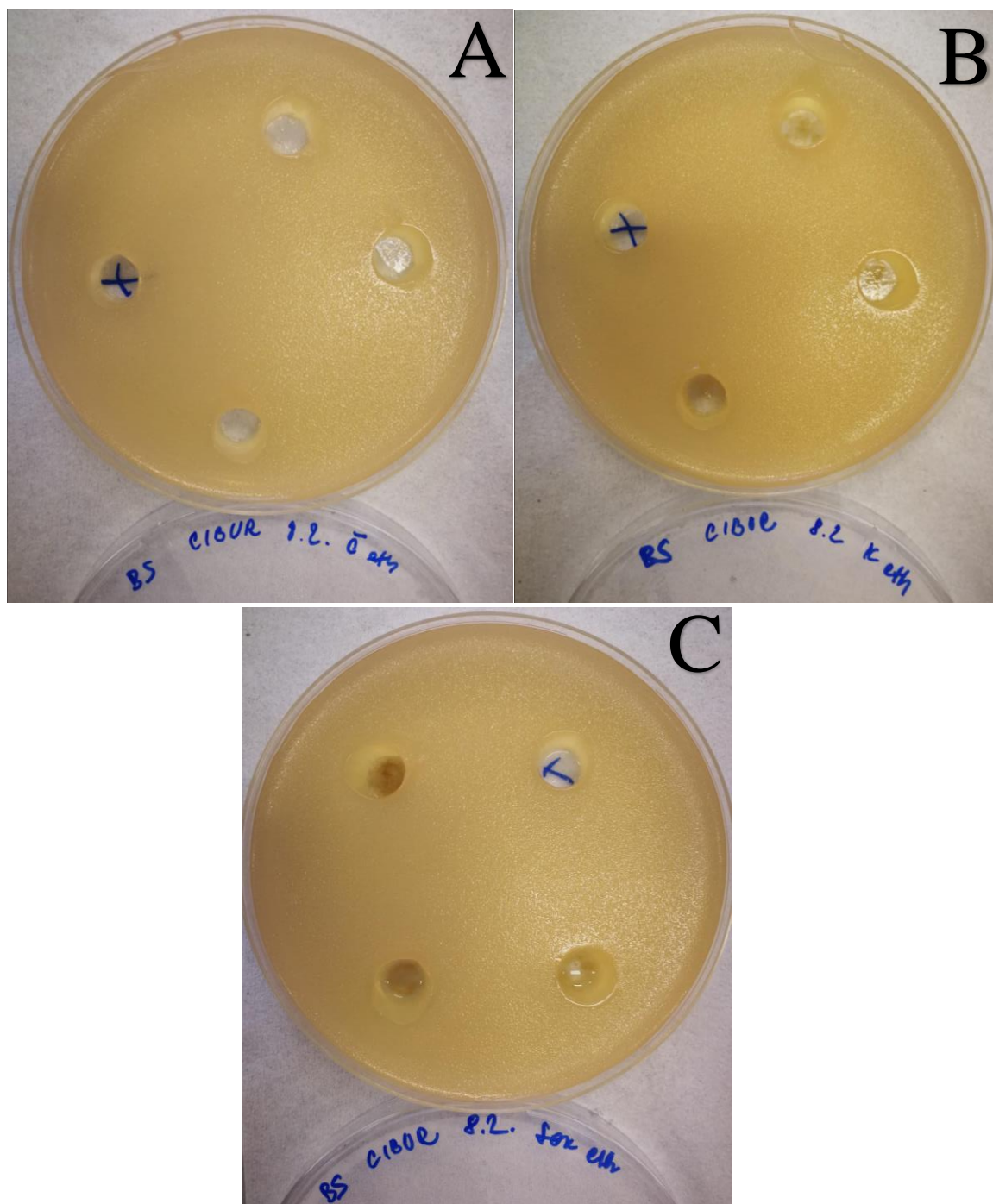
Obr. 33 Porovnanie vzniku inhibičných zón pri 72 h kultivácii *Micrococcus luteus* vplyvom bio zázvorového čaju Sonnentor (A) 30 min výluh v destilovanej vode (B) 30 min v etanole (C) 60% etanolový macerát



Obr. 34 Porovnanie vzniku inhibičných zón pri 72 h kultivácii *Bacillus cereus* vplyvom testovaných vzoriek macerátov (A) 60% macerát Sonnentor (B) 80% macerát Kotányi (C) 60% čerstvého zázvoru



Obr. 35 Porovnanie vzniku inhibičných zón pri 72 h kultivácii *Serratia marcescens* vplyvom testovaných vzoriek 30 min vodných výluhov (A) čerstvého zázvoru (B) Kotányi (C) Sonnentor



Obr. 36 Porovnanie vzniku inhibičných zón pri 72 h kultivácii *Bacillus subtilis* vplyvom testovaných vzoriek 30 min etanolových výluhov (A) čerstvého zázvoru (B) Kotányi (C) Sonnentor

5 Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanoviť obsah bioaktívnych látok v troch rôznych vzorkách zázvoru. Testovaný bol čerstvý zázvor pôvodom z Číny, sušený koreninový prípravok značky Kotányi a bio 100% zázvorový čaj značky Sonnentor. Stanovovaný bol obsah celkových polyfenolov a flavonoidov a následne bola meraná antioxidačná aktivita jednotlivých vzoriek. Vybrané vzorky boli testované pre ich potencionálne antimikrobiálne účinky. Vzorky boli pripravené dvomi spôsobmi – ako maceráty a výluhy. Maceráty boli pripravené zo šiestich koncentrácií etanolu (0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 96 %), pričom odbery prebiehali každých 24 h po dobu 96 h. Výluhy boli pripravené zaliatím vzoriek zázvoru 96% etanolom a destilovanou vodou s teplotou 100 °C. Odbery prebiehali v intervale 5 min po dobu 30 min.

V analyzovaných vzorkách je veľmi ťažké nájsť spoločný trend pri extrakcii bioaktívnych látok. Najväčší obsah polyfenolických látok bol nameraný v 30 min výluhu sušeného koreninového prípravku Kotányi. Najväčší obsah flavonoidov zas v 30 min výluhu bio zázvorového čaju značky Sonnentor. Ten vykazoval aj najvyššiu antioxidačnú aktivitu a taktiež ako jediná vzorka výluhu vykazoval antimikrobiálnu aktivitu voči grampozitívnej baktérii *M. luteus*. Vo všeobecnosti môžeme konštatovať, že vo vzorkách sušeného zázvoru boli namerané vyššie hodnoty bioaktívnych látok a taktiež vykazovali vyššiu antioxidačnú aktivitu ako vzorka 30 min výluhu čerstvého zázvoru. Väčší obsah bioaktívnych látok a s tým spojenou vyššou antioxidačnou aktivita vzoriek sušeného zázvoru môže byť spôsobená dehydratačnými reakciami prebiehajúcimi pri sušení. Tie vedú ku zmene chemického zastúpenia jednotlivých látok a ku premene prítomných polyfenolov na ich biologicky aktívnejšie dehydrované formy.

Pri porovnaní extrakcie bioaktívnych látok v priebehu 96 h macerácie môžeme naopak sledovať, že najvyšší obsah polyfenolov bol zaznamenaný v 80% etanolovom maceráte bio čaju Sonnentor a najväčší obsah flavonoidov v jeho 96% etanolovom maceráte. Opäť môžeme pozorovať trend, kde vyšší obsah bioaktívnych látok pozorujeme v macerátoch sušeného zázvoru. Všetky vzorky zázvoru extrahovali bioaktívne látky najlepšie do etanolových macerátov o vyššej koncentrácií ako do destilovanej vody. Aj napriek tomu, že vzorky sušeného zázvoru obsahovali v 96 h vyššiu koncentráciu bioaktívnych látok ako 96% macerát čerstvého zázvoru, ten dosiahol najvyššiu antioxidačnú aktivitu. Opäť mohol byť tento výsledok ovplyvnený nie len extrakčným činidlom, ale aj postupmi využívanými pri spracovaní čerstvého zázvoru na sušený, pri jeho tepelnej, či mechanickej úprave.

Antimikrobiálne účinky jednotlivých zázvorových vzoriek boli stanovené voči trom grampozitívnym baktériám *B. subtilis*, *B. cereus* a *M. luteus*. Testovanou gramnegatívnou baktériou bola *S. marcescens*. Testované boli etanolové a vodné výluhy všetkých troch vzoriek v 30 min a 96 h maceráty: 60% etanolový macerát čerstvého zázvoru, 80% etanolový macerát sušeného koreninového prípravku Kotányi a 60% etanolový macerát bio zázvorového čaju Kotányi. Voči baktériám *S. marcescens*, *B. subtilis* a *B. cereus* nebola účinná ani jedna testovaná vzorka zázvoru. Voči *M. luteus* vykazoval antimikrobiálne účinky jedine 30 min etanolový výluh bio čaju Sonnentor a jeho 96 h macerát 60% etanolu.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] RAVINDRAN, P.N. The encyclopedia of Herbs & Spices. Glasgow: Bell and Bain, 2017. ISBN 9781780643151.
- [2] WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva: World Health Organization, 2009. ISBN 92-415-4517-8.
- [3] DHANIK, Jyotsna, Neelam ARYA a Viveka NAND. A Review on Zingiber officinale. Journal of phatmacognosy and phytochemistry [online]. 2017, 2017(6(3), 174-184 [cit. 2019-05-04]. ISSN 2278-4136. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/f2b9/cd5644c9f0e65ab9460d49aa609ca22a1baa.pdf>
- [4] (ALI, Badreldin H., Gerald BLUNDEN, Musbah O. TANIRA a Abderrahim NEMMAR. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): A review of recent research. Food and Chemical Toxicology. 2008, 46(2), 409-420. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.085. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004243>
- [5] ALI, Ammar Mohammed Ahmed, Mawahib ElAmin Mohamed EL-NOUR, Sakina Mohamed YAGI, Satoshi YAMAUCHI, Tomomi MAEKAWA a Yoshiaki SONE. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (Zingiber officinale Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. Elsevier, 2018, 2016, 16(2), 677-682. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.03.003. ISBN 9780081000229. ISSN 1687157X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687157X18300210>
- [6] OBOH, Ganiyu, Ayodele J. AKINYEMI a Adedayo O. ADEMILUYI. Antioxidant and inhibitory effect of red ginger (Zingiber officinale var. Rubra) and white ginger (Zingiber officinale Roscoe) on Fe2 induced lipid peroxidation in rat brain in vitro. Experimental and Toxicologic Pathology. 2012, 64(1-2), 31-36. DOI: 10.1016/j.etp.2010.06.002. ISSN 09402993. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940299310001016>
- [7] FINGLAS, Paul a Fidel TOLDRA, CABALLERO, Benjamin, ed. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2. USA: Academic Press, 2003. ISBN 9780080917917.
- [8] KIZHAKKAYIL, Jaleel a B. SASIKUMAR. Diversity, characterization and utilization of ginger: a review. Plant Genetic Resources. 2011, 9(3), 464-477. DOI: 10.1017/S1479262111000670. ISSN 1479-2621. Dostupné také z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1479262111000670/type/journal_article
- [9] BELITZ, H.-D, Werner GROSCH a Peter SCHIEBERLE. Food Chemistry. 4th rev. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2009. ISBN ISBN 978-3-540-69934-7.
- [10] SHUKLA, Abhishek, S.N. NAIK, Vaibhav V. GOUD, Chandan DAS a Ashraf B. ABDEL-NAIM. Supercritical CO2 extraction and online fractionation of dry ginger for production of high-quality volatile oil and gingerols enriched oleoresin. Industrial Crops and Products. 2019, 130, 352-362. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.01.005. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019300056>

- [11] CABALLERO, Benjamin, Paul M. FINGLAS a Fidel TOLDRA. Encyclopedia of food and health. Vol. 5. Boston: Academic Press is an imprint of Elsevier, [2016]. ISBN 978-012-3849-472.
- [12] JAHODÁŘ, Luděk. Farmakobotanika: semenné rostliny. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9.
- [13] Ginger. PETER, K.V. Handbook of herbs and spices. 2. Oxford: Woodhead, 2012, s. 319-335. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-0-85709-039-3.
- [14] Illustration of Zingiber officinale Roscoe. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Z%C3%A1zvor_1%C3%A9ka%C5%99sk%C3%BD#/media/File:Zingiber_officinale_-_K%C3%B6hler%2080%93s_Medizinal-Pflanzen-146.jpg
- [15] PAKRASHI, Anita a S.C. PAKRASHI. Ginger : A Versatile Healing Herb [online]. India: Vedams ebooks Pvt, 2003 [cit. 2019-05-04]. ISBN 8179360083. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=zfxLvxEvAh0C&pg=PA42&hl=sk&source=gbs_toc_r&cad=3#v=onepage&q&f=false
- [16] ALI, Badreldin H., Gerald BLUNDEN, Musbah O. TANIRA a Abderrahim NEMMAR. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): A review of recent research. Food and Chemical Toxicology. 2008, 46(2), 409-420. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.085. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004243>
- [17] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 2. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.
- [18] VARAKUMAR, Sadineni, Kannamangalam Vijayan UMESH a Rekha S. SINGHAL. Enhanced extraction of oleoresin from ginger (Zingiber officinale) rhizome powder using enzyme-assisted three phase partitioning. Food Chemistry. 2017, (vol. 216), 27-36. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.180. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616312134>
- [19] ORIANI, Vivian Boesso, Izabela Dutra ALVIM, Bruno Nicolau PAULINO, Fernanda Ramalho PROCÓPIO, Glaucia Maria PASTORE a Miriam Dupas HUBINGER. The influence of the storage temperature on the stability of lipid microparticles containing ginger oleoresin. Food Research International. 2018, (vol. 109), 472-480. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.04.066. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691830351X>
- [20] HAQ NAWAZ, Bhatti, Haq NAWAZ BHATTI a Zafar IQBAL. Chemical analysis of essential oil of ginger (Zingiber officinale). Pakistan journal of biological sciences [online]. Pakistan, 2005, 2005(8(11), 1576-1578 [cit. 2019-05-04]. ISSN 1028-8880. Dostupné z: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2005/1576-1578.pdf>
- [21] JELLED, Aicha, Ângela FERNANDES, Lillian BARROS, Hassiba CHAHDOURA, Lotfi ACHOUR, Isabel C.F.R. FERREIRA a Hassen Ben CHEIKH. Chemical and antioxidant parameters of dried forms of ginger rhizomes. Industrial Crops and Products. 2015, 77, 30-35.

DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.08.052. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015303538>

- [22] EZZAT, Shahira M., Marwa I. EZZAT, Mona M. OKBA, Esther T. MENZE a Ashraf B. ABDEL-NAIM. The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) potent in vivo and in vitro anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018, 214, 113-123. DOI: 10.1016/j.jep.2017.12.019. ISSN 03788741. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117328763>
- [23] GYAWALI, Rabin a Salam A. IBRAHIM. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 2014, 46, 412-429. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. ISSN 09567135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351400320X>
- [24] https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0031942215300509-gr1_lrg.jpg
- [25] JUNG, Mun Yhung, Min Kyoung LEE, Hee Jeong PARK, et al. Heat-induced conversion of gingerols to shogaols in ginger as affected by heat type (dry or moist heat), sample type (fresh or dried), temperature and time. *Food Science and Biotechnology*. 2018, 27(3), 687-693. DOI: 10.1007/s10068-017-0301-1. ISSN 1226-7708. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-017-0301-1>
- [26] LEE, Jienny, Sae Woong OH, Seoung Woo SHIN, Kyung-Woo LEE, Jae-Youl CHO a Jongsung LEE. Zingerone protects keratinocyte stem cells from UVB-induced damage. *Chemico-Biological Interactions*. 2018, 279, 27-33. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.11.004. ISSN 00092797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717307846>
- [27] AHMAD, Bilal, Muneeb U. REHMAN, Insha AMIN, et al. A Review on Pharmacological Properties of Zingerone (4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone). *The Scientific World Journal*. 2015, (vol. 2015), 1-6. DOI: 10.1155/2015/816364. ISSN 2356-6140. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/816364/>
- [28] https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0944711313004169-gr1_lrg.jpg
- [29] VELÍŠEK, JAN a JANA HAJŠLOVÁ. *CHEMIE POTRAVIN I + II*. 3. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [30] ALSHERBINY, Muhammad A., Wessam H. ABD-ELSALAM, Shymaa A. EL BADAWY, Ehab TAHER, Mohamed FARES, Allan TORRES, Dennis CHANG a Chun Guang LI. Ameliorative and protective effects of ginger and its main constituents against natural, chemical and radiation-induced toxicities: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, (123), 72-97. DOI: 10.1016/j.fct.2018.10.048. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518307816>
- [31] NILE, Shivraj Hariram a Se Won PARK. Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds. *Industrial Crops and Products*. 2015, 70, 238-244. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.033. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015002228>

- [32] ŠVARC-GAJIĆ, Jaroslava, Aleksandra CVETANOVIĆ, Antonio SEGURA-CARRETERO, Isabel Borrás LINARES a Pavle MAŠKOVIĆ. Characterisation of ginger extracts obtained by subcritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, 123, 92-100. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.12.019. ISSN 08968446. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616304442>
- [33] SAXENA, Roopali, Ritu ANEJA, Vaibhav V. GOUD, Chandan DAS a Ashraf B. ABDEL-NAIM. Multitalented Ginger and Its Clinical Development for Cancer Treatment: A spice with multiple health beneficial potentials. *Role of Nutraceuticals in Chemoresistance to Cancer*. Elsevier, 2018, 2018, 5(1), 351-370. DOI: 10.1016/B978-0-12-812373-7.00018-8. ISBN 9780128123737. ISSN 22134344. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128123737000188>
- [34] STOILOVA, I, A KRASTANOV, A STOYANOVA, P DENEV a S GARGOVA. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*. 2007, 102(3), 764-770. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.06.023. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460600481X>
- [35] SRINIVASAN, Krishnapura, S.N. NAIK, Vaibhav V. GOUD, Chandan DAS a Ashraf B. ABDEL-NAIM. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*. 2017, 5(1), 18-28. DOI: 10.1016/j.phanu.2017.01.001. ISSN 22134344. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213434416300676>
- [36] ALSHERBINY, Muhammad A., Wessam H. ABD-ELSALAM, Shymaa A. EL BADAWY, Ehab TAHER, Mohamed FARES, Allan TORRES, Dennis CHANG a Chun Guang LI. Ameliorative and protective effects of ginger and its main constituents against natural, chemical and radiation-induced toxicities: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier, 2019, 2018, 123(1), 72-97. DOI: 10.1016/j.fct.2018.10.048. ISBN 9780128123737. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518307816>
- [37] CÖMERT, Ezgi Doğan, Vural GÖKMEN, Abhinav MISHRA, Mark A. HARRISON, Tim MOHR, Meryl SILVERMAN a Wiktor NIEMCZUK. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century: a case report and review of the literature. *Food Research International*. 2018, 105(1), 76-93. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.056. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691730741X>
- [38] YUKSEL, Zerrin, Elif AVCI, Yasar Kemal ERDEM a V. SUCHÝ. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry*. 2010, 121(2), 450-456. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.064. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609014848>
- [39] GYAWALI, Rabin, Salam A. IBRAHIM, Abhinav MISHRA, Mark A. HARRISON, Tim MOHR, Meryl SILVERMAN a Wiktor NIEMCZUK. Natural products as antimicrobial agents: a case report and review of the literature. *Food Control*. 2014, 46(1), 412-429. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. ISSN 09567135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351400320X>
- [40] HOLLMAN, Peter C.H. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. 2009, 42(sup1), 74-83. DOI:

10.3109/13880200490893492. ISSN 1388-0209. Dostupné také z:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200490893492>

- [41] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3. 2.* Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 808665902X.
- [42] LIEBERMAN, Shari a Nancy BRUNING. *The real vitamin and mineral book: a definitive guide to designing your personal supplement program.* 4. New York: Avery, 2007. ISBN 15-833-3274-X.
- [43] SINCLAIR, James a Audrey WILSON. *A self help guide to VITAMINS & MINERALS.* Canada: Mediscript Communications, 2015. ISBN 1550402285.
- [44] LAVŘÍKOVÁ, Petra, Josef FONTANA a Jan TRNKA. *Vitaminy a výživa. Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skriptum*[online]. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva/>
- [45] AMIN, Fakhra, Wajihullah KHAN a Bilqees BANO. Oxidation of cystatin imparted by riboflavin generated free radicals: Spectral analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 2019, 2018, 124, 1281-1291. *Advances in Food and Nutrition Research*. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.021. ISBN 9780128118030. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018353571>
- [46] COMBS, Gerald F. a James P. MCCLUNG. Thiamin. *The Vitamins*. Elsevier, 2017, 2017, , 297-314. DOI: 10.1016/B978-0-12-802965-7.00011-3. ISBN 9780128029657. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029657000113>
- [47] *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier, 2017, 44. ISBN 9780128029657. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166916301914>
- [48] <https://www.vix.com/es/imj/salud/2009/11/09/medicina-ortomolecular-vitamina-b1-y-b2>
- [49] http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/usp28nf23s0_m73500.htm
- [50] KIRKLAND, James B. a Mirella L. MEYER-FICCA. Niacin. *New Research and Developments of Water-Soluble Vitamins*. Elsevier, 2018, 2018, 44, 83-149. *Advances in Food and Nutrition Research*. DOI: 10.1016/bs.afnr.2017.11.003. ISBN 9780128118030. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452617300396>
- [51] <https://health4all.co.uk/the-differences-between-vitamin-b3-niacin-and-b3-nicotinamide/>
- [52] UNLU, Ahmet, Onder KIRCA, Mustafa OZDOGAN a Erdinç NAYIR. High-dose vitamin C and cancer: Spectral analysis. *Journal of Oncological Science*. Elsevier, 2016, 2018, 1, 10-12. *Advances in Food and Nutrition Research*. DOI: 10.1016/j.jons.2015.11.010. ISBN 9780128118030. ISSN 24523364. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452336415000114>
- [53] KHALIFE, Roy, Anthony GRIECO, Karima KHAMISA, Alan TINMOUH, Chris MCCUDDEN a Elianna SAIDENBERG. Scurvy, an old story in a new time: The hematologist's experience. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2019, 76. DOI:

10.1016/j.bcmd.2019.01.004. ISSN 10799796. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979619300142>

- [54] <http://sciencemission.com/site/index.php?page=news&type=view&id=cancer%2Fvitamin-c-may-boost>
- [55] PAULOVÁ, HANA, HANA BOCHOŘÁKOVÁ a EVA TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. Chemické listy. 2004, 2004(98), 174-179.
- [56] SRINIVASAN, Krishnapura. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*. 2017, 5(1), 18-28. DOI: 10.1016/j.phanu.2017.01.001. ISSN 22134344. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213434416300676>
- [57] MASUDA, Yuki, Hiroe KIKUZAKI, Masashi HISAMOTO a Nobuji NAKATANI. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors*. 2004, 21(1-4), 293-296. DOI: 10.1002/biof.552210157. ISSN 09516433. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.552210157>
- [58] EZZAT, Shahira M., Marwa I. EZZAT, Mona M. OKBA, Esther T. MENZE a Ashraf B. ABDEL-NAIM. The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) potent in vivo and in vitro anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018, 214, 113-123. DOI: 10.1016/j.jep.2017.12.019. ISSN 03788741. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117328763>
- [59] MASUDA, Toshiya, Jun AKIYAMA, Aya FUJIMOTO, Satoshi YAMAUCHI, Tomomi MAEKAWA a Yoshiaki SONE. Antioxidation reaction mechanism studies of phenolic lignans, identification of antioxidation products of secoisolariciresinol from lipid oxidation. *Food Chemistry*. 2010, 123(2), 442-450. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.065. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610005224>
- [60] KOŽURKOVÁ, Mária. Cvičenia z biochémie mikroorganizmov[online]. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2011 [cit. 2019-05-05]. ISBN 9788070978962. Dostupné z: <https://unibook.upjs.sk/img/cms/2011/pf/cvicenia-z-biochemie-mikroorganizmov.pdf>
- [61] AĞAOĞLU, SEMA, NURSEL DOSTBİL a SÜLEYMAN ALEMDAR. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME SPICES USED IN THE MEAT INDUSTRY. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2007, 2007(51), 53-57.
- [62] JAY, James M., Martin J. LOESSNER a David Allen GOLDEN. *Modern food microbiology*. 7. New York: Springer, 2005. ISBN 03-872-3413-6.
- [63] Antimicrobial resistance. World Health Organization [online]. 2018 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [64] KARUPPIAH, Ponmurugan, Shyamkumar RAJARAM, Aya FUJIMOTO, Satoshi YAMAUCHI, Tomomi MAEKAWA a Yoshiaki SONE. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, 2(8), 597-601. DOI:

10.1016/S2221-1691(12)60104-X. ISSN 22211691. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S222116911260104X>

- [65] AGHAZADEH, Marzieh, Abed ZAHEDI BIALVAEI, Mohammad AGHAZADEH, Fahimeh KABIRI, Negar SALIANI, Mehdi YOUSEFI, Hosein ESLAMI a Hossein SAMADI KAFIL. Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of *Zingiber officinale* (in Vitro Study). *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2016, 9(2). DOI: 10.5812/jjm.30167. ISSN 2008-3645. Dostupné také z: <http://jjmicrobiol.neoscriber.org/en/articles/56624.html>
- [66] FICKER, C., M. L. SMITH, K. AKPAGANA, M. GBEASSOR, J. ZHANG, T. DURST, R. ASSABGUI a J. T. ARNASON. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytotherapy Research*. 2003, 17(8), 897-902. DOI: 10.1002/ptr.1335. ISSN 0951-418X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1335>
- [67] FLOEGEL, Anna, Dae-Ok KIM, Sang-Jin CHUNG, Sung I. KOO, Ock K. CHUN, Catherine RICE-EVANS a Wiktor NIEMCZUK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods: a case report and review of the literature. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011, 24(7), 1043-1048. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.01.008. ISSN 08891575. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088915751100038X>
- [68] KASOTE, Deepak M., Surendra S. KATYARE, Mahabaleshwar V. HEGDE a Hanhong BAE. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. 2015, 11(8), 982-991. DOI: 10.7150/ijbs.12096. ISSN 1449-2288. Dostupné také z: <http://www.ijbs.com/v11p0982.htm>
- [69] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG, Catherine RICE-EVANS a Wiktor NIEMCZUK. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay: a case report and review of the literature. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9-10), 1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. ISSN 08915849. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584998003153>
- [70] KAMEYA, Hiromi, Jun WATANABE, Yuko TAKANO-ISHIKAWA, Setsuko TODORIKI, Ock K. CHUN, Catherine RICE-EVANS a Wiktor NIEMCZUK. Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR: a case report and review of the literature. *Food Chemistry*. 2014, 145(7), 866-873. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.015. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613012557>
- [71] KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ. SKRIPTA KE CVIČENÍ Z OBECNÉ MIKROBIOLOGIE, CYTOLOGIE A MORFOLOGIE BAKTERIÍ[online]. In: . Brno: MASARYKOVA UNIVERZITA, 2017, s. 146 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/mik/wp-content/uploads/2016_Mikrobiologie_cvi%C4%8Den%C3%AD.pdf
- [72] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.

- [73] MALACHOVÁ, Kateřina. Praktikum z mikrobiologie. Vyd. 2. Ostrava: Ostravská univerzita, 2007. ISBN 978-80-7368-411-2.
- [74] VACHÁLKOVÁ, Anna, Ladislav NOVOTNÝ, Andrea SOLIVAJSOVÁ a V. SUCHÝ. Polarographic behavior of flavanoids from propolis and their potential carcinogenicity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1995, 36(2), 137-143. DOI: 10.1016/0302-4598(94)01754-O. ISSN 03024598. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030245989401754O>
- [75] Dilution Worksheet and Problems [online]. In: . May 2, 2019 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: https://bio.libretexts.org/Ancillary_Materials/Experiments/Microbiology_Labs_I/04%3A_Dilution_Worksheet_and_Problems
- [76] BEN-DAVID, Avishai, Charles E. DAVIDSON, Aya FUJIMOTO, Satoshi YAMAUCHI, Tomomi MAEKAWA a Yoshiaki SONE. Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier, 2014, 2010, 107(8), 214-221. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.08.023. ISBN 9780702040641. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214002577>
- [77] SANDLE, Tim, Charles E. DAVIDSON, Aya FUJIMOTO, Satoshi YAMAUCHI, Tomomi MAEKAWA a Yoshiaki SONE. Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology*. Elsevier, 2016, 2016, 107(8), 171-183. DOI: 10.1016/B978-0-08-100022-9.00014-1. ISBN 9780081000229. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081000229000141>
- [78] KAHLMETER, Gunnar, Derek BROWN, Aya FUJIMOTO, Satoshi YAMAUCHI, Tomomi MAEKAWA a Yoshiaki SONE. Laboratory control of antimicrobial therapy. *Antibiotic and Chemotherapy*. Elsevier, 2010, 2010, 2(8), 115-122. DOI: 10.1016/B978-0-7020-4064-1.00009-9. ISBN 9780702040641. ISSN 22211691. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702040641000099>
- [79] WEBER, Gerhard. Dehydration factors for products of the spice industry. In: *ESA European spice association* [online]. 2008 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/publications-esa>
- [80] HUDECOVÁ, D., ŠIMKOVIČ, M. 2011. Mikrobiológia. 2. vyd Bratislava: Slovenská technická univerzita v Nakladateľstve STU, 2011. 266 p. ISBN 978-80-227-3600-8.
- [81] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [82] RAFII, F. *ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY*. 2. Poland: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-384730-0.
- [83] HEJAZI, A., F. R. FALKINER, T. MARTINEC, Alicja BERNAD, Hanna GŁOWACKA, Beata WIĘCEK a Wiktor NIEMCZUK. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 1997, 46(11), 903-912. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné také z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>

- [84] ZENG, Hua-Wei, Yu-Jie CAI, Xiang-Ru LIAO, Feng ZHANG, Yu-Lin LI, Xiang-Kang ZENG a Da-Bing ZHANG. *Serratia marcescens* SYBC08 catalase isolated from sludge containing hydrogen peroxide shows increased catalase production by regulation of carbon metabolism. *Engineering in Life Sciences*. 2011, 11(1), 37-43. DOI: 10.1002/elsc.201000115. ISSN 16180240. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201000115>
- [85] EARL, Ashlee M., Richard LOSICK, Roberto KOLTER, Andreas GREINER, Eyal ZUSSMAN, J. Stefan ROKEM a Charles GREENBLATT. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 2008, 16(6), 269-275. DOI: 10.1016/j.tim.2008.03.004. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X08000887>
- [86] WANG, Tao, Yafei LIANG, Mianbin WU, Zhengjie CHEN, Jianping LIN, Lirong YANG a Da-Bing ZHANG. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2015, 23(4), 744-754. DOI: 10.1016/j.cjche.2014.05.020. ISSN 10049541. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1004954115000051>
- [87] SARIKHANI, Maliheh, Rouha Kasra KERMANSHAHI, Parinaz GHADAM, Sara GHARAVI, Eyal ZUSSMAN, J. Stefan ROKEM a Charles GREENBLATT. The role of probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBSu on planktonic cells and biofilm formation of *Bacillus subtilis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 115(6), 762-766. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017316033>
- [88] NGUYEN, Angela T., Sandra M. TALLENT, Abhinav MISHRA, Mark A. HARRISON, Tim MOHR, Meryl SILVERMAN a Wiktor NIEMCZUK. Screening food for *Bacillus cereus* toxins using whole genome sequencing: a case report and review of the literature. *Food Microbiology*. 2019, 78(1), 164-170. DOI: 10.1016/j.fm.2018.10.008. ISSN 07400020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002018302284>
- [89] JUNEJA, Vijay K., Chase E. GOLDEN, Abhinav MISHRA, Mark A. HARRISON, Tim MOHR, Meryl SILVERMAN a Wiktor NIEMCZUK. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice: a case report and review of the literature. *International Journal of Food Microbiology*. 2019, 290(1), 49-58. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.023. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518307165>
- [90] PEKALA, Agnieszka, Ewa PAŹDZIOR, Jerzy ANTYCHOWICZ, Alicja BERNAD, Hanna GŁOWACKA, Beata WIĘCEK a Wiktor NIEMCZUK. *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*. 2018, 486(6), 285-289. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.12.028. ISSN 00448486. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848617314576>
- [91] PEKALA, Purvi M., Pooja P. PATEL, Vrinda S. THAKER, Alicja BERNAD, Hanna GŁOWACKA, Beata WIĘCEK a Wiktor NIEMCZUK. Whole genome sequences and annotation of *Micrococcus luteus* SUBG006, a novel phytopathogen of mango. *Genomics Data*. 2015, 6(6), 10-11. DOI: 10.1016/j.gdata.2015.07.022. ISSN 22135960. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221359601500166X>

- [92] KOCUR, M., Z. PACOVA, T. MARTINEC, Alicja BERNAD, Hanna GŁOWACKA, Beata WIĘCEK a Wiktor NIEMCZUK. Taxonomic Status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and Designation of the Neotype Strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1972, 22(4), 218-223. DOI: 10.1099/00207713-22-4-218. ISSN 0020-7713. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-22-4-218>
- [93] MILTIADOUS, George, Moses ELISAF, T. MARTINEC, Alicja BERNAD, Hanna GŁOWACKA, Beata WIĘCEK a Wiktor NIEMCZUK. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*. 2011, 5(1), 903-912. DOI: 10.1186/1752-1947-5-251. ISSN 1752-1947. Dostupné také z: <https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-1947-5-251>
- [94] LETNIK, Ilya, Ron AVRAHAMI, Rafi PORT, Andreas GREINER, Eyal ZUSSMAN, J. Stefan ROKEM a Charles GREENBLATT. Biosorption of copper from aqueous environments by *Micrococcus luteus* in cell suspension and when encapsulated. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2017, 116(4), 64-72. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.09.029. ISSN 09648305. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830516304565>
- [95] HAN, YanQuan, YuXin LI, YongZhong WANG, JiaRong GAO, LunZhu XIA a Yan HONG. Comparison of fresh, dried and stir-frying gingers in decoction with blood stasis syndrome in rats based on a GC–TOF/MS metabolomics approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 129, 339-349. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.07.021. ISSN 07317085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708516303934>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

°C — stupeň Celzia

μ — micro, 10⁻⁶

ABTS — 2,2-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

ATP — Adenozíntrifosfát

B. — *Bacillus*

DPPH — 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyllovýu radikál

FDA — Food and Drug Administration

GA — kyselina galova

K — katechin

MIC — minimálna inhibičná koncentrácia

M. — *Micrococcus*

NAD — nikotínamid adenín difosfát

NADP — nikotínamid adenín dinukleotid fosfát

ORAC — kapacita absorpcie kyslíkových radikálov

pH — koncentrácia vodíkových iónov

S. — *Serratia*

T — trolox

UV/VIS — Ultrafialovo-viditeľná